Zur Chemie und Pharmakologie der „Pfeilgiftdroge" Lophopetalum toxicum LOHER, Celastraceae

Helmut Habermeier

1981

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Zur Chemie und Pharmakologie der "Pfeilgiftdroge"

Lophopetalum toxicum LOHER, Celastraceae

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Helmut Habermeier

aus

Mühldorf/Inn

Dezember 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. H. Z e n k

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 1981

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
EINLEITUNG		1
ALLGEMEINER TEIL		2
1.	Allgemeine Übersicht	2
1.1.	Vorkommen und botanische Beschreibung von Lophopetalum toxicum	2
1.1.1.	Systematik	2
1.1.2.	Vorkommen und Beschreibung der Pflanze	3
1.2.	Verwendung der Droge	9
1.3.	Bisherige Untersuchungen über die Stammrinde von Lophopetalum toxicum	9
2.	Eigene Untersuchungen von Inhaltsstoffen von Lophopetalum toxicum	11
2.1.	Vorarbeiten	11
2.2.	Chromatographische Voruntersuchung	11
2.3.	Prüfung der Toluolfraktion A 1 und der Äthanolfraktion A 2 auf Herzwirksamkeit	15
2.4.	Herstellung eines zweiten vorgereinigten Extraktes	15
2.4.1.	Extraktionsverfahren bei Herzglykosiddrogen	15
2.4.2.	Orientierende chemische Untersuchungen	17
2.4.3.	Vergleichende Farbreaktionen	19
2.5.	Isolierung der Herzglykoside	23
2.5.1.	Extraktion und Vorreinigung der Droge	23
2.5.2.	Isolierung der Glykoside D 1 und D 2	26
2.5.3.	Isolierung der Glykoside D 3, E und F	26
2.5.4.	Isolierung der Glykoside E, F, G 1 und G 2	27
3.	Strukturaufklärungen	29
3.1.	Glykosid D 1	29
3.2.	Glykosid D 2	39
3.2.1.	Strukturaufklärung des isolierten Glykosids	39
3.2.2.	Synthese von Strophanthidinchinovosid	43
3.3.	Glykosid D 3	45
3.4.	Glykosid E	51

Seite

3.5. Glykosid F 64
3.6. Glykosid G 1 76
3.7. Glykosid G 2 83
3.8. Andere KEDDE-positive Substanzen 90
4. Analytische Verfahren 91
4.1. FD-MS- und D/IC-Spektroskopie 91
4.2. Zuckeranalyse mit dem Zuckeranalysator 96
4.3. HPLC-Untersuchungen 101
4.3.1. Analytische und semipräparative Trennung der Cardenolide durch HPLC 101
4.3.2. Vergleich HPLC-DC 103
5. Pharmakologische Untersuchungen 106
5.1. Prüfung auf Antitumorwirksamkeit am P-388-Modell und Nasopharynx-Epidermis-System 106
5.2. Prüfung auf Cytotoxizität durch den ^{3}H-Thymidintest an Asciteszellen 107
5.3. Prüfung auf positiv inotrope Wirkung 109
6. Chemische und pharmakologische Untersuchungen an anderen Lophopetalum-Arten 112
6.1. Lophopetalum wightianum ARN. 112
6.2. Lophopetalum arnhemicum N.BYRNES 114
7. Übersicht über die bisher in Celastraceen gefundenen Herzglykoside 116
8. Z U S A M M E N F A S S U N G 120

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L 122
1. Herkunft der Drogen 122
2. Allgemeine Arbeitsmethoden 122
2.1. Dünnschichtchromatographie 122
2.1.1. Adsorbentien 122
2.1.2. Laufmittelsysteme 123
2.1.3. Detektion 123
2.2. Säulenchromatographie 125
2.2.1. Sorbentien 125
2.2.2. Laufmittel 125

Seite

2.3. Droplet Counter-Current Chromatographie (DCCC) 125
2.4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) 126
2.5. Zuckeranalysator 126
2.6. Physikalisch-chemische Untersuchungen . . . 127
2.7. Pharmakologische Untersuchungen 128
2.7.1. Test auf positiv inotrope Wirkung 128
2.7.2. Test auf Cytotoxizität 129
2.7.2.1. Screening auf Antitumorwirksamkeit am NCI . 129
2.7.2.2. Hemmung der ^{3}H-Thymidin-Einbauraten in Asciteszellen 130
3. Spezielle Arbeitsmethoden 131
3.1. Voruntersuchung von Lophopetalum toxicum . 131
3.2. Isolierung der Glykoside 132
3.3. Hydrolysen 135
3.3.1. Trifluoressigsäure-Hydrolyse 135
3.3.2. Mikrohydrolyse auf der DC-Platte 136
3.3.3. Enzymhydrolysen 136
3.4. Synthese des Strophanthidinchinovosids . . 137
3.5. Vergleichende Screening-Untersuchungen von Lophopetalum toxicum, L.wightianum und L.arnhemicum 138
4. Ergebnisse 140
4.1. Meßdaten 140
4.2. Identifizierung von weiteren Cardenoliden aus Lophopetalum toxicum 149
5. Herkunft der Vergleichssubstanzen 149

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 150

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0057

E I N L E I T U N G

Im Rahmen eines vom National Institute of Cancer Research in Bethesda durchgeführten Screening Programmes zeigten Extrakte aus der Rinde von Lophopetalum toxicum eine signifikante cytotoxische Wirkung. Die Droge stammt von einem zur Celastraceen-Familie gehörenden Baum, der auf den Philippinen heimisch ist und dessen Rinde früher von Indios zur Pfeilgifther stellung verwendet wurde. Die Untersuchungen wurden vom NCI wegen angeblicher Instabilität des Wirkprinzipes und fehlenden Drogennachschubes abgebrochen. Nachdem uns im Jahre 1976 aus Manila Drogenmaterial zur Verfügung gestellt wurde, versuchten wir in den vorliegenden phytochemischen und pharmakologischen Untersuchungen zu klären, welche Inhaltsstoffe der Droge für die cytotoxische Wirkung verantwortlich sind und welcher chemischen Substanzklasse diese Verbindungen angehören. Da bisher nur einige triviale Triterpene aus der Droge isoliert werden konnten und die bisherigen pharmakologischen Untersuchungen nur vage Hinweise auf eine Herzwirksamkeit erbracht hatten, wurde die phytochemische Bearbeitung von Grund auf neu konzipiert.

A L L G E M E I N E R T E I L

1. Allgemeine Übersicht

1.1. Vorkommen und botanische Beschreibung von Lophopetalum toxicum

1.1.1. Systematik

Die untersuchte Droge gehört zur Familie der Celastraceen in der Ordnung Celastrales.

Nach der FLORA MALESIANA von 1962 [1] sind folgende synonyme Bezeichnungen für Lophopetalum toxicum (LOHER) (MERR.) in Gebrauch:

Hippocratea maingayi (VIDAL)
Lophopetalum celebicus (KOORD.)
Lophopetalum fimbriatum (F.-VILL.) (VIDAL)
Lophopetalum fuscescens (KURZ) (KING) (RIDL.)
Lophopetalum intermedium (RIDL.)
Lophopetalum javanicum (ZOLL.) (VALETON) (KOORD.)
Lophopetalum oblongifolium (KING) (RIDL.) (LOES.)
Lophopetalum oblongum (KING) (RIDL.) (CRAIB)
Lophopetalum paucinervum (MERR.)
Solenospermum javanicum (ZOLL.)
Solenospermum oblongifolium (LOES.)
Solenospermum paucinervium (LOES.)
Solenospermum toxicum (LOES.)

1.1.2. Vorkommen und Beschreibung der Pflanze

Standorte der Pflanze sollen Siam, Malaysia, Sumatra, Java, die Philippinen, Borneo, die Molukken und Neu-Guinea sein. Sie bevorzugt Höhenlagen bis maximal 1500 m. Man findet sie in Regenwaldgebieten, teilweise auch auf Lehmboden und in sumpfigen Überschwemmungsgebieten.

Die Droge besteht aus der Stammrinde des nach "MEDICINAL PLANTS OF THE PHILIPPINES" [2] 25 m, nach der FLORA MALESIANA bis zu 45 m hohen, im Durchmesser 1 m zählenden Baumes.

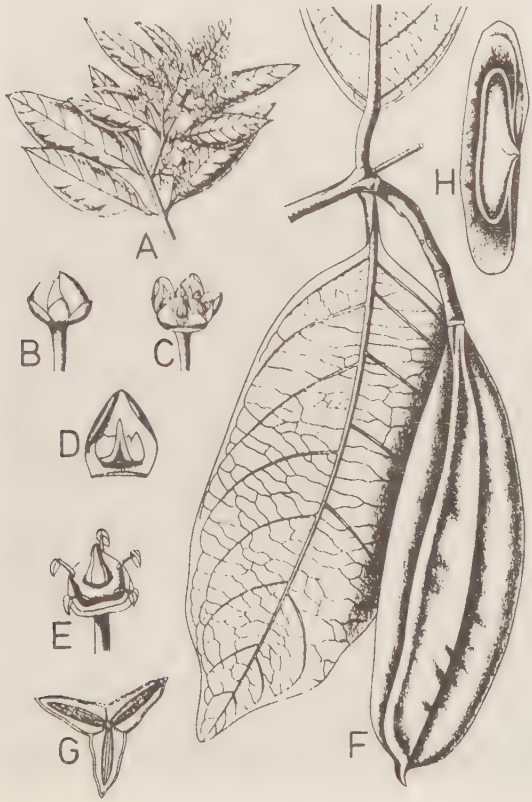
Abb. 1

Standortaufnahme
(aus: FLORA MALESIANA)

Abb. 2
Herbarpflanze von Lophopetalum toxicum aus dem Jahre 1899
(Botanisches Institut, München)

Die ledrigen, meist elliptischen oder lanzettförmigen Blätter erreichen Längen zwischen 5.5 bis 18 cm bei einer Breite von 2.5 - 10 cm. Die Blütenstände bestehen aus Rispen mit grünlich-weißen Blüten von ca. 9 mm Durchmesser, deren Kelchblätter nur am Grunde verwachsen sind. Die 2 - 3 Petalen sind im oberen Bereich fein bewimpert und dreigeteilt, wobei der mittlere Lappen

meist etwas länger als die beiden anderen ist. Aus dem Rand des fleischigen, leicht fünfeckigen und papillösen Diskus wachsen die Stamina auf ca. 1.5 mm langen Filamenten hervor. Der dreifächrige Fruchtknoten weist je 5 - 8 Samenanlagen auf. Die Früchte werden zwischen 6.5 und 11 cm lang und verfügen über ein dünnes, ledriges Pericarp. Die Samen sind geflügelt.



A = Blütenzweig (1/4 der Originalgröße)

B - E = Blütenknospe und Blüte (Vergrößerung bei B und C 6fach; D 12fach; E 4fach)

F = Fruchtzweig (Originalgröße)

G = Fruchtquerschnitt (Originalgröße)

H = Samen (Originalgröße)

Abb. 3
Lophopetalum toxicum LOES., Habituszeichnung (nach KOORDERS und VALETON, Atlas der Baumarten von Java, 1913)

Die zur chemischen Analyse zur Verfügung stehende Droge bestand makroskopisch aus älteren, außen gelblichen bis dunkelbraunen Stammrindenstücken. Die Außenrinde war teilweise von Rissen durchzogen und stark mit narbigen Korkwarzen bedeckt. Die hellgelbe Innenseite war dicht mit Bastfasern durchzogen. Beide Schichten wurden durch eine rötlichbraune Mittelschicht getrennt, die wie die Außenrinde glatt zu brechen war (Abb. 4).

Abb. 4

Querschnitt durch die Rinde
(Aufnahme mit LEITZ-AMR 1200 B Elektronenmikroskop)+)

+) Professor Dr.D.Fengel, Institut für Holzforschung der Universität München

Mikroskopisch erkennbar waren in der Außenrinde die nach außen hin obliterierten Korkzellschichten mit Lentizellen (Abb. 5).

Abb. 5

Lentizelle
(LEITZ-AMR 1200 B)

Die Mittelschicht wies mehrere Reihen isodiametrischer und darauffolgend längsgestreckter, unregelmäßig geformter und getüpfelter Zellen und vereinzelte gelbliche Steinzellen auf (Abb.6).

Abb. 6

Unregelmäßig getüpfelte parenchymatische Zellen
(LEITZ-AMR 1200 B)

In der Innenrinde waren die Bastfaserbündel von Kristallzellreihen mit je einem Calziumoxalatkristall umgeben. Sie waren durch Markstrahlen voneinander getrennt. Vereinzelt fanden sich Parenchymzellen mit braunem Inhalt.

1.2. Verwendung der Droge

LOHER [3] berichtete 1897 als erster, daß die philippinischen Negritos den wässrigen Drogenextrakt zum Vergiften ihrer Pfeile, Speere und anderer Waffen benutzten. BRILL und WELLS [4] beschreiben auch genau die Giftbereitung: "Die Rinde wird in Wasser eingeweicht und gequetscht. Der ausgespreßte Saft wird dann eingedickt." Sie erwähnen weiter, daß man jeden Kontakt mit "sauren Substanzen" meiden solle, um die Wirkung nicht zu mindern oder aufzuheben. Als Antidot bei Verletzung mit dem Gift werde u.a. Essig verwendet.

Über eine therapeutische Anwendung der Droge in der Volksmedizin des Landes ist nichts bekannt.

1.3. Bisherige Untersuchungen über die Stammrinde von Lophopetalum toxicum

GALVIALO [5] isolierte 1914 ein "Glykosid", das in der Rinde in einer Konzentration von ca. 0.2% enthalten sein sollte. Aus Äthanol kristallisiert wies das "Lophopetalin" genannte Glykosid von der Summenformel $C_{36}H_5O_6$ einen Smp. von 225 - 230°C, aus Diäthyläther von 190 - 195°C auf. Pharmakologische Teste wurden nicht durchgeführt.

1917 beschrieben BRILL und WELLS eine weiße, wachsartige, chloroformlösliche Substanz vom Smp. 183°, die sie in einer Ausbeute von 0.8% aus der Rinde erhalten hatten. Pharmakologische Teste verliefen negativ. Aus den wasserlöslichen Anteilen der Droge kristallisierten aus Äthanol unterschiedlich geformte Kristalle aus. 2.1 mg dieses als "Rohsaponin" bezeichneten Substanzgemisches töteten innerhalb von weniger als 2 Stdn. ein 523 g wiegendes Meerschweinchen. Die Prüfung der Droge auf Alkaloide verlief negativ.

Die einzigen ausführlichen Arbeiten über Lophopetalum toxicum liegen von DIETERLE, LEONHARDT und DORNER [6,7] aus den Jahren 1933 und 1934 vor. Sie konnten die Phythosterine Lupeol

($C_{32}H_{52}O_2$, Smp. 211 - 212°), Betulin ($C_{26}H_{46}O_3$, Smp. 252°) und ein weiteres unbekannter Struktur ($C_{29}H_{48}O_3$, Smp. 279 - 281°) isolieren. Um die für die Herzwirksamkeit verantwortlichen Substanzen zu lokalisieren, wurden mit Wasser und verschiedenen organischen Lösungsmitteln Extrakte angefertigt und ihre Wirkung am Froschherz überprüft. Dabei erwies sich ein äthanolischer Auszug als am wirksamsten. Die weitere Aufarbeitung ergab ein gelbes, amorphes, stark hygroskopisches "Rohglykosid", aus dem sie das gelblich gefärbte "Lophopetalid" der Summenformel $C_{59}H_{78}O_{25}$ und vom Smp. = 195 - 197° kristallisierten. Dieses Lophopetalid zeigte eine cardiotone Wirkung. Das Rohglykosid war jedoch viermal wirksamer. Außerdem konnte noch das in der Celastraceenfamilie weit verbreitete Dulcit [88] isoliert werden. Den Autoren war es somit nur gelungen, den glykosidischen Charakter der herzwirksamen Substanzen nachzuweisen. Nach einer Privatmitteilung von Prof.Dr. Luz Oliveros-Belardo [+) 89] ist auf dem 29. PPhA Annual Meeting and National Convention von VILLEGAS-CASTILLO und ESPEJO-ENRIQUEZ [++)] über Untersuchungen an Lophopetalum toxicum berichtet worden. Danach konnten durch fraktionierte Kristallisation aus verschiedenen Extrakten drei Substanzen isoliert werden.

A: Smp. 239 - 241°
B: Smp. 234 - 236°
C: Smp. 232 - 234°

Diese seien möglicherweise isomer. Die UV-Analyse ergab ein Maximum bei 243 nm. Für die Substanz C wurde IR-spektroskopisch die Anwesenheit von -OH, $-CH_3$, $-CH_2-$ und -CH= -Gruppen wahrscheinlich gemacht. Möglicherweise hatte es sich hierbei um Phytosterine vom Typ der pentazyklischen Triterpene ähnlich Lupeol oder Betulin gehandelt.

+) Natural Science Research Center, The Philippine Women's University, Taft Avenue, Manila 2801, Philippines

++) College of Pharmacy, University of the Philippines

2. Eigene Untersuchung

2.1. Vorarbeiten

Aus einer einmaligen Lieferung vom Mai 1977 standen uns insgesamt nur 1.5 kg Rindendroge zur Verfügung +) (identisch mit Drogenmuster Bl. 1).

Im Rahmen eines allgemeinen Drogenscreenings wurden nach den Vorschriften des NCI ++) je ein Äthanol- und Chloroformextrakt bereitet. Der Äthanolextrakt ergab in den vom NCI durchgeführten in vivo-Versuchen eine positive Wirkung (siehe Allg.Teil 5.1., S.106). Wegen der geringen Drogenmenge mußte ein besonders schonendes und quantitatives Extraktionsverfahren gefunden werden. Diese Voruntersuchung sollte auch der Prüfung auf die vermutete positiv inotrope Wirkung dienen.

Die Extraktbereitung erfolgte nach einer allgemeinen, zur Anreicherung von Herzglykosiden vorliegenden Vorschrift. Wir extrahierten 20 g fein gepulverte Droge 1 Stde. mit 150 ml 70%-igem Äthanol unter Rückfluß. Die Lösung wurde mehrmals mit Petroläther ausgeschüttelt und nach Zusatz von 60 ml Wasser wiederholt mit Chloroform unterschichtet. Die gesammelten und eingedampften Unterphasen (Fraktion A) verwendeten wir zur DC-Untersuchung. Ein Teil davon wurde in Äthanol 70% aufgenommen und mehrmals mit Toluol ausgeschüttelt. Zur ersten DC-Untersuchung standen eine Toluolfraktion A 1 und eine Äthanolfraktion A 2 zur Verfügung.

2.2. Chromatographische Voruntersuchung

Die Fraktionen A 1 und A 2 wurden dünnschichtchromatographisch im System Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:13.4:10) (Kieselgelplatten) auf Herzglykoside und zusätzlich Alkaloide untersucht. In Fraktion A 1 war lediglich eine starke UV-Löschung unmittelbar unterhalb der Laufmittelfront erkennbar.

+) Trotz mehrfacher Anfragen bei philippinischen Universitätsinstituten und der Deutschen Botschaft in Manila gelang es nicht, eine Nachlieferung zu erhalten.

++) National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA.

Fraktion A 2 zeigte im mittleren und unteren R_f-Bereich Löschungen im UV_{254}, ferner bei höherer Substanzkonzentration im Frontbereich der Platte zwei Fluoreszenzflecken im UV_{366}. Am deutlichsten sichtbar war eine Löschung bei R_f = 0.2, die bei einer Auftragemenge von 10 µl in zwei Flecken trennbar war. Mit dem KEDDE-Reagenz [8] modifiziert nach LEWBART [9] färbten sich die meisten Flecke mit UV-Löschung ebenso wie die mitchromatographierten Testsubstanzen Digitoxin, k-Strophanthosid und Convallatoxin bläulichrot an. Die KEDDE-positiven Flecken fluoreszierten nach Schwefelsäurebehandlung im UV_{366} schwach. k-Strophanthosid und Convallatoxin ergaben sowohl am Tageslicht als auch im UV-Bereich gelbgrüne Farben. Nach etwa 30 Min. waren die Tageslichtfarben in braun übergegangen.
Die Fraktion A 1 gab keine KEDDE-positive Reaktion.

Laufmittel: Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:13.4:10) (BITTNER [86])
Detektion: 1. UV_{256}
2. a) KEDDE-Reagenz
b) Konz.Schwefelsäure, Erhitzen, Auswerten bei Tageslicht und im UV_{366}
3. Dragendorff-Reagenz
(2. und 3. wurden auf zwei identischen Platten durchgeführt)

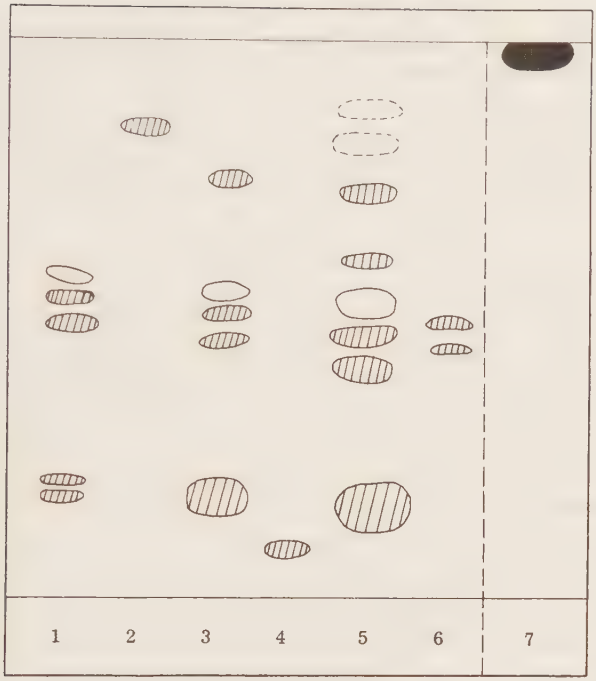


Abb. 7
Chromatographische Voruntersuchung

1 = Fraktion A 2 (10 µl)
2 = Digitoxin
3 = Fraktion A 2 (50 µl)
4 = k-Strophanthosid
5 = Fraktion A 2 (100 µl)
6 = Convallatoxin
7 = Fraktion A 1 (100 µl)

= UV_{366}-Fluoreszenz
= UV_{254}-Löschung
= KEDDE-positiv, UV_{366}-Fluoreszenz nach H_2SO_4-Behandlung
= Dragendorff-positiv (orange)

Eine positive Reaktion mit dem sehr spezifischen KEDDE-Reagenz weist auf das Vorliegen eines α,β-ungesättigten γ-Lactonringes mit 2 freien Protonen in Allylposition hin, wie er bei Cardenoliden vorliegt 19,20). Die mit dem KEDDE-Reagenz auftretenden Färbungen reichen von blau über blauviolett und rotviolett bis rot. Nach einigen Minuten verschwindet die Färbung. Sie kann mehr-

mals durch erneutes Besprühen wieder hervorgerufen werden. Schließlich kommt es zur Braunfärbung. Einfache Lactone, wie z.B. β-Hydroxymethylbutenolide 22), zeigen eine über Stunden stabile rötliche Färbung, welche ebenfalls, wenn auch erst sehr viel später, in braun bis rotbraun übergeht. Dies dürfte auf Hydrolyse des Lactonrings und Zersetzung des Reagenzes zurückzuführen sein 23). Entscheidend für die unterschiedliche Haltbarkeit der entstehenden Färbungen könnte die Stabilität der sich bildenden Komplexe sein.

Steroidfreie Strukturen weisen im Unterschied zu Steroiden nach Behandlung mit Säuren keine Fluoreszenzentwicklung auf.

Fraktion A 1 konnte in einem weniger polaren Laufmittelsystem aufgetrennt werden, wobei sich 9 deutliche Löschungen im UV_{256} ergaben. Alle färbten sich mit DRAGENDORFF-Reagenz [10] unterschiedlich stark orange an.

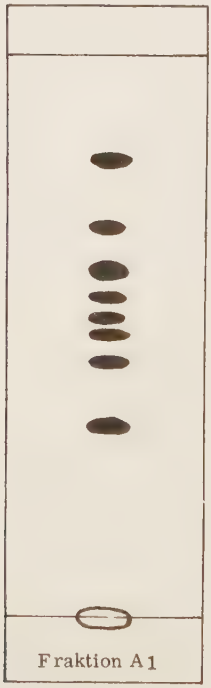


Abb. 8
Chromatographische Voruntersuchung

Laufmittelsystem: Diisopropyläther-
Dichlormethan-Äthylacetat-Äthanol
(50:30:15:1)
(Kieselgel)

Detektion: wie vorher 1 und 3 (Abb. 7)

Fraktion A wurde zusätzlich auf einer Tüpfelplatte mit den Alkaloidfällungsreagentien nach VALSER [11], WAGNER [12] und MAYER [12] untersucht. Die schwach positiven Reaktionen deuteten darauf hin, daß die DRAGENDORFF-positiven Flecken der Fraktion A 1 nur zum Teil von Alkaloiden stammen. Daneben sollten noch nichtalkaloidische Strukturen mit konjugierten Carbonyl- oder Lactonfunktionen existieren [13].

2.3. Prüfung der Toluolfraktion A 1 und der Äthanolfraktion A 2 auf Herzwirksamkeit

Wir prüften die Fraktionen A 1 und A 2 auf positiv inotrope Wirkung am isolierten Herzmuskel in einer Versuchsanordnung nach REITER [14]. Fraktion A 1 erwies sich als unwirksam. A 2 degegen zeigte eine deutliche positiv inotrope Wirkung bereits bei einer Extraktmenge von 1.28 mg in der Badflüssigkeit. Diese Wirksamkeit ist mit der anderer stark wirksamer Herzglykosiddrogen vergleichbar. Die pharmakologisch interessanten Verbindungen befanden sich daher in der Fraktion A 2. Die Teste und das chromatographische Verhalten wiesen auf Herzglykoside mit vergleichsweise hoher Hydrophilie hin. Auf Grund der Polaritätsverhältnisse war eine gewisse Strukturverwandtschaft mit Strophanthus- oder Convallaria-Glykosiden wahrscheinlich.

Die im NCI-Test gefundene cytotoxische Wirksamkeit befand sich im gleichen Polaritätsbereich wie die KEDDE-positiven Substanzen.

2.4. Herstellung eines zweiten vorgereinigten Extraktes

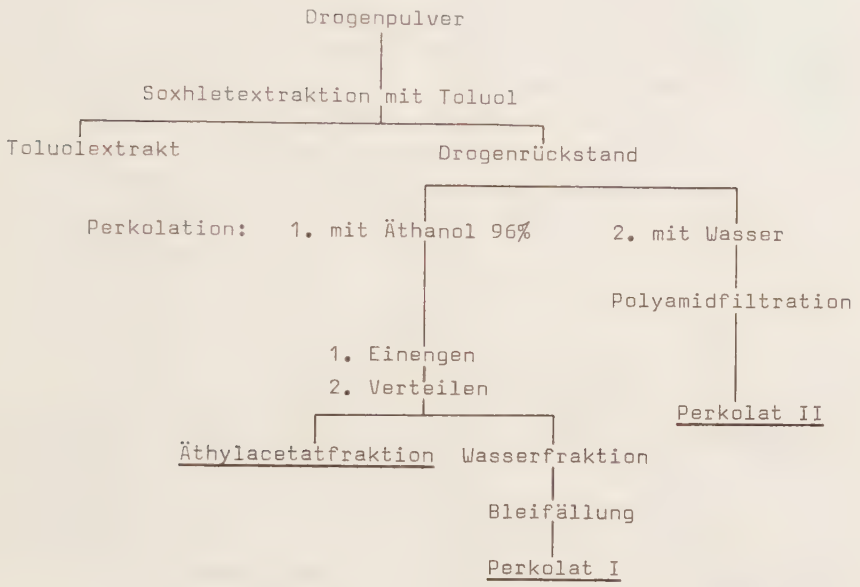
2.4.1. Extraktionsverfahren bei Herzglykosiddrogen

Herzglykoside werden vorwiegend aus alkoholischen oder wässrig-alkoholischen Extrakten isoliert. Dem Drogenmaterial werden zuvor mit Petroläther Fette, Chlorophyll und andere lipophile Substanzen entzogen. Da in den Drogen gewöhnlich

glucoseabspaltende Enzyme, wie Strophanthobiase (Strophanthus kombé), Digilanidase (Digitalis lanata), Digipurpuridase (D. purpurea) und Scillarenase (Scilla maritima) enthalten sind, arbeiteten STOLL et al. 15) in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen (z.B. Ammoniumsulfat), um die Enzyme zu denaturieren und auszufällen. Eine Inaktivierung kann auch durch Erwärmung (ca. 40°) oder Alkoholeinwirkung erreicht werden. Ballaststoffe, wie Gerbstoffe, Farbstoffe und Saponine, werden durch Schwermetallsalzlösungen beseitigt. MANNICH et al. 16) führten 1930 Untersuchungen mit Bleiacetat durch. STOLL 17) und TAMM 18) benutzten frisch gefälltes Bleihydroxid. Überschüssiges Blei wurde mit Natriumphosphat oder Ammoniumsulfat entfernt. Nach einem Patent von STRAUB 21) kann aus Eisen-(III)-sulfat und Calziumcarbonat frisch bereitetes Eisen-(III)-hydroxid mit guten Glykosidausbeuten verwendet werden. Überschüssige Calzium- und Eisenionen wurden mit Natriumphosphat abgetrennt.

Wegen der bisherigen guten Ergebnisse wurde zur Abtrennung lipophiler Begleitstoffe an Stelle von Petroläther Toluol verwendet. Die fein gepulverte Droge wurde mit Toluol am Soxhlet extrahiert und anschließend mit 96%igem Äthanol sowie Wasser perkoliert. Das äthanolische Perkolat wurde mit Wasser versetzt, der Äthanolanteil am Rotationsverdampfer weitgehend abdestilliert und die verbleibende Suspension gegen Äthylacetat verteilt. Mit der Wasserphase führten wir eine Bleiacetatfällung durch. Der Überstand ergab Perkolat I. Das wässrige Perkolat lieferte nach Aufschwemmen in Polyamidpulver und Filtration das Perkolat II. Das Auswaschen der anfallenden feindispersen Niederschläge der Bleiacetatmethode führte zu großen Verlusten. Außerdem enthielt das Eluat noch größere Mengen an wasserlöslichen Alkalisalzen. Die Polyamidfiltration ist nur im rein wässrigen Milieu anwendbar, da selbst geringe Mengen organischer Lösungsmittel die Gerbstoffbindung beeinträchtigen. Sie benötigt aber nur einen einzigen Arbeitsschritt, wobei das Sorbens leicht mit Wasser ausgewaschen werden kann. Die Verluste durch irreversible Sorption von Glykosiden an Polyamid dürften eher geringer als bei der ersten Methode sein.

Trennschema für den zweiten Extrakt:



2.4.2. Orientierende chemische Untersuchungen

Toluollösung und Äthylacetatfraktion wurden mit den zuvor genannten Alkaloidfällungsreagenzien versetzt. Nur in der Äthylacetatfraktion konnten Alkaloide nachgewiesen werden. Damit war der Befund der "Alkaloidfreiheit" von BRILL und WELLS [4] nicht bestätigt.

Perkolat I und II lieferten im DC nach Detektion mit KEDDE-Reagenz insgesamt 15 KEDDE-anfärbbare Substanzen. Perkolat I enthielt vor allem die Verbindungen A bis D 4, während im Perkolat II die stark hydrophilen Verbindungen angereichert waren. Die Äthylacetatfraktion zeigte negative Reaktion.

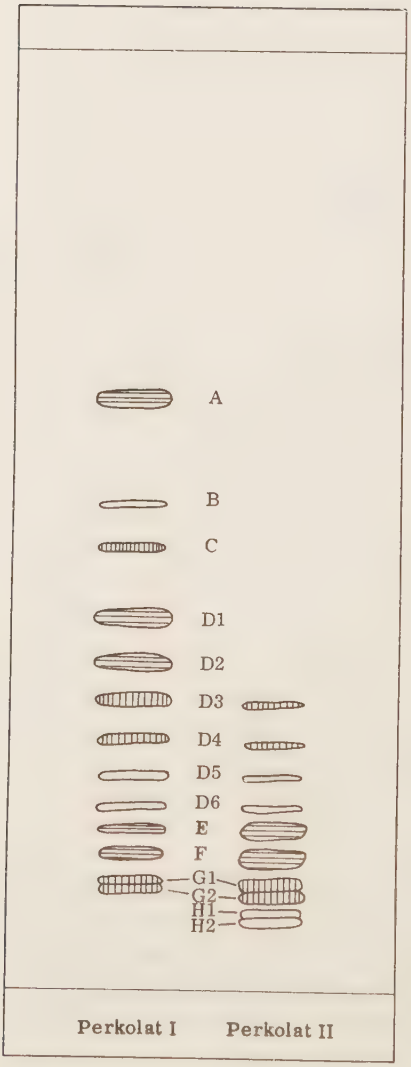


Abb. 9
KEDDE-positive Substanzen
in Lophopetalum toxicum

Laufmittel: Äthylacetat-
Äthanol-Methanol-Wasser
(100:5:13,4:10)

Detektion: KEDDE-Reagenz

Färbungen:

= blauviolett

= rotviolett

= wegen zu niedriger Konzentration keine Farbdifferenzierung möglich

(Farbunterschiede sind nur im direkten Vergleich feststellbar !)

Perkolat II enthielt allerdings noch Verunreinigungen, die am Auftragspunkt verblieben. Für den Hauptisolierungsgang erschien es daher günstiger, die Extraktion nicht mit 96%igem Äthanol und Wasser, sondern von Angang an mit 70%igem Äthanol durchzuführen. Damit sollte es möglich sein, das ganze Spektrum der KEDDE-positiven Substanzen zu erfassen, ohne zuviele unerwünschte wasserlösliche Begleitsubstanzen mit zu extrahieren. Eine Behandlung mit Wasser würde sich dann erübrigen, obwohl mit Verlusten an den Glykosiden G 1 bis H 2 zu rechnen war.

2.4.3. Vergleichende Farbreaktionen

Wie bereits von anderen Autoren durchgeführte Untersuchungen zeigen, ergeben Herzglykoside je nach Substitutionstyp und Zuckeranteil sehr verschiedenartige Farbreaktionen. Während Nitro-haltige Detektionsmittel, wie z.B. alkalische Dinitrobenzoesäure (KEDDE) [9], Dinitrobenzol (RAYMOND) [24,25] oder Trinitrobenzol (BALJET) [26] mit dem Butenolidring reagieren, finden die Umsetzungen mit Säuren oder säurehaltigen Reagenzien (z.B. Vanillin/Schwefelsäure [27], Chloramin/Trichloressigsäure [48]) an Steroidgerüst und Zucker statt. An der Farbausbildung am Tageslicht sind zu einem großen Teil die Zucker beteiligt, während Fluoreszenzen im UV_{366} auf die Aglyka zurückzuführen sind [90]. Das häufig bei Cardenoliden und Bufadienoliden benutzte Antimon-(III)-chlorid reagiert nur mit dem Steroidgerüst.

T a b e l l e 1: DC-Farb- und Fluoreszenzvergleiche

Substanz	Aglykon + Zucker	H_2SO_4 85%				$SbCl_3/CHCl_3$	
		VIS		UV_{366}		120°, 10 Min.	
		1 Min.	10 Min. 120°	1 Min.	10 Min. 120°	UV_{366}	VIS
Lophopetalum tox.	D_1, D_2, E , F	gelb	gelbgrün	gelbgrün	grün	gelbgrün	graugrün
Glykoside	D_3, D_4, G_1, G_2	gelblich	braun	hellblau	grün	hellblau	rotbraun
Digitoxigenin	Digitoxigenin --	grünlich	bläulich-grün	-	türkis	blaugrün	türkis
Digitoxin	Digitoxigenin + 3 Digitoxose	innen grün außen dunkelbraun	grauviolett	-	blau-schwarz	braunrot	violett
Lanatosid A	Digitoxigenin + 2 Digitoxose + 1 Acetyldigitoxose + 1 Glucose	grünlich	grauviolett	-	blau-schwarz	blau	grau
Evomonosid	Digitoxigenin + 1 Rhamnose	grünlich	gelbbraun	-	dunkel-grün	blaugrün	türkis
Evonosid	Digitoxigenin + 1 Rhamnose + 2 Glucose	grünlich	gelbbraun	-	dunkel-grün	blaugrün	türkis
Digoxin	Digoxigenin + 3 Digitoxose	innen grün außen dunkelbraun	grauviolett	-	dunkel-blau	blau	blau-schwarz
Lanatosid C	Digoxigenin + 2 Digitoxose + 1 Acetyldigitoxose + 1 Glucose	braun	grauviolett	-	dunkel-blau	blau	grau

Fortsetzung Seite 21

Fortsetzung: Tabelle 1

Substanz	Aglykon + Zucker	H_2SO_4 85%				$SbCl_3/CHCl_3$	
		VIS		UV_{366}		120°, 10 Min.	
		1 Min.	10 Min. 120°	1 Min.	10 Min. 120°	UV_{366}	VIS
α-Acetyldigoxin	Digoxigenin + 2 Digitoxose + 1 Acetyl-(3)-digitoxose	innen braungrün außen violettbraun	grauviolett	-	dunkelblau	blau	blauschwarz
β-Acetyldigoxin	Digoxigenin + 2 Digitoxose + 1 Acetyl-(4)-digitoxose	violett	violett	-	dunkelblau	blau	blauschwarz
Lanatosid B	Gitoxigenin + 2 Digitoxose + 1 Acetyldigitoxose + 1 Glucose	braungrün	dunkelviolett	-	innen grauschwarz außen ocker	blau	grau
Gitaloxin	Gitaloxigenin + 3 Digitoxose	-	grauviolett	blau	innen grau außen ocker	blau	graugrün
g-Strophanthin (Ouabain)	g-Strophanthidin + 1 Rhamnose (Ouabagenin)	-	grünlich	-	gelborange	gelbgrün	schwachgelb
k-Strophanthidin	k-Strophanthidin --	gelb	gelbgrün	gelbgrün	grün	grün	blaugrau
Cymarin	k-Strophanthidin + 1 Cymarose	gelbgrün	graugrün	gelbgrün	graugrün	graugrün	blaugrau
k-Strophanthin-β	k-Strophanthidin + 1 Cymarose + 1 Glucose	gelbbraun	graugrün	gelbgrün	graugrün	graugrün	blaugrau
k-Strophanthosid	k-Strophanthidin + 1 Cymarose + 2 Glucose	gelbbraun	graugrün	gelbgrün	graugrün	graugrün	blaugrau

Fortsetzung Seite 22

Fortsetzung: Tabelle 1

Substanz	Aglykon + Zucker	H_2SO_4 85%				$SbCl_3/CHCl_3$	
		VIS		UV_{366}		120°, 10 Min.	
		1 Min.	10 Min. 120°	1 Min.	10 Min. 120°	UV_{366}	VIS
Convallatoxin	k-Strophanthidin + 1 Rhamnose	gelb	gelbgrün	gelbgrün	grün	gelbgrün	graugrün
Helveticosid	k-Strophanthidin + 1 Digitoxose	gelbgrün	graugelb	gelbgrün	graugrün	rötlich	blaugrau-rötlich
Adonitoxin	Adonitoxigenin + 1 Rhamnose	schwach grün	rotviolett	blau	rotviolett	hellbraun	UV_{254} blaue Fl.
Convallatoxol	k-Strophanthidol + 1 Rhamnose	bräunlich	braun	bräunlich	gelblich-grün	orange	rotviolett
Proscillaridin A	Scillarenin + 1 Rhamnose	bläulich	dunkelgrün	grün	grün	grün	grünlich
Scillaren A	Scillarenin + 1 Rhamnose + 1 Glucose	bläulich-rot	dunkelgrün	grün	grün	grün	grünlich
Scillirosid	Scillirosidin + 1 Glucose	bläulich	dunkelgrün	grün	grün	grün	grünlich UV_{254} grünl.Fl.
Hellebrin	Hellebrigenin + 1 Rhamnose + 1 Glucose	-	hellgrün	-	braungrün	grün	hellgrün
Helleborogenon	Helleborogenon ---	dunkelrot	grünbraun-grau	rötlich	gelb	braunrot	oliv
Oleandrin	Oleandrigenin + 1 Oleandrose	-	blauschwarz	blau	innen blauschwarz außen ocker	blaugrün	braungrün UV_{254} hellblaue Fl.

Die Färbungen mit Schwefelsäure sind am leichtesten reproduzierbar. Bei der Detektion mit Antimon-(III)-chlorid ergeben sich jedoch je nach Konzentration und Temperatureinwirkung von Platte zu Platte verschiedene Farben.

Die Tageslichtfarben und UV_{366}-Fluoreszenzen waren bei A, D 1, D 2, E, F und Convallatoxin nicht verschieden. Deutlich waren die Gelbfärbungen der meisten DC-Flecken nach Schwefelsäurebehandlung am Tageslicht, was auf ähnliche Zucker hindeutete. Gelb färben sich insbesondere die in Herzglykosiden häufig vorkommenden 6-Desoxyhexosen. Diese können frei und glykosidisch gebunden von entsprechenden 2-Desoxyhexosen (z.B. 2-Desoxy-D-glucose), 2,6-Desoxyhexosen (z.B. Digitoxose) und deren 3-O-methylderivaten (z.B. Cymarose) bzw. deren Glykosiden durch die Xanthydrol-Reaktion [30,31] unterschieden werden. Xanthydrol führt bei 2-Desoxyhexosen oder -pentosen zu einer bleibenden Rosa- bis Rotfärbung. Substanzflecken mit 6-Desoxyzuckern färben sich dagegen orangerötlich und bleichen nach 5 Min. weißlich aus. Die Xanthydrolreaktion gab bei den Lophopetalumglykosiden D 1, D 2, D 3, D 4, E, F, G 1 und G 2 eine Ausbleichung, sodaß mit dem Vorliegen von 6-Desoxyzuckern zu rechnen war.

Die DC-Untersuchungen deuteten darauf hin, daß die Herzglykoside von Lophopetalum toxicum der Cardenolidreihe angehören. Die Färbungen waren bei einem Teil der Substanzen sehr ähnlich bis identisch denen der k-Strophanthidin-Reihe. Als Zucker kamen 6-Desoxyhexosen in Betracht.

2.5. Isolierung der Herzglykoside

2.5.1. Extraktion und Vorreinigung der Droge

854 g Stammrindenpulver wurden mit Toluol extrahiert und dann mit 70%igem Äthanol perkoliert, bis in der abtropfenden Lösung chromatographisch keine KEDDE-positiven Substanzen mehr nachweisbar waren. Das alkoholische Perkolat wurde einer Bleiacetatfällung unterworfen.

Nach der von REICHSTEIN [91] eingeführten Verteilungsmethode der Glykoside zwischen organischen Lösungsmitteln und Wasser wurden 0.4 g Ätherfraktion "A1" und 0.26 g Chloroformfraktion "B" erhalten. Eine weitere Verteilung der wässrigen Extraktlösung gegen ein Gemisch von Chloroform-Äthanol (9:1) bzw. Chloroform-Äthanol (4:1) erbrachte 0.2 g der Fraktion "C" und 0.15 g der Fraktion "D". Aus Verteilungen gegen Chloroform-Äthanol (2:1) und Chloroform-Äthanol (3:2) resultierten nochmals 1.9 g Fraktion "E" und 6.5 g Fraktion "F". Die zurückbleibende Extraktlösung "G" war frei von KEDDE-positiven Substanzen.

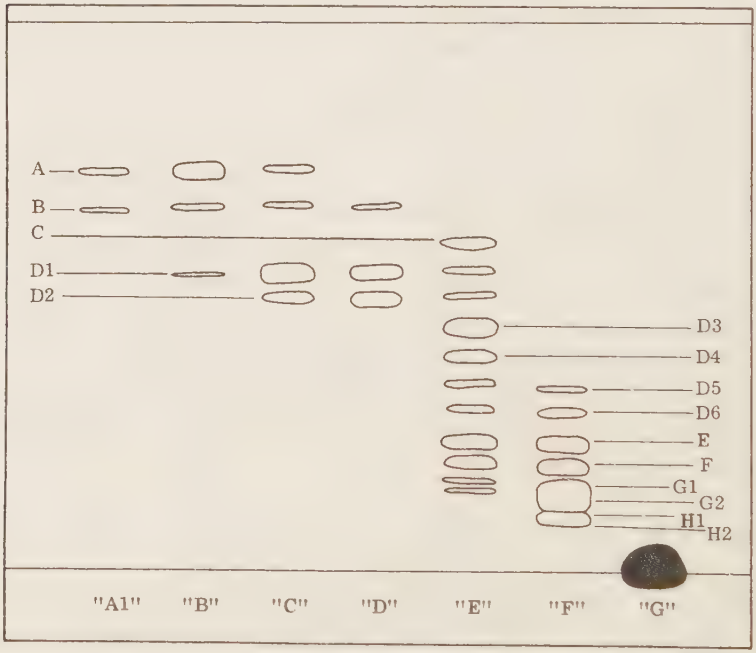
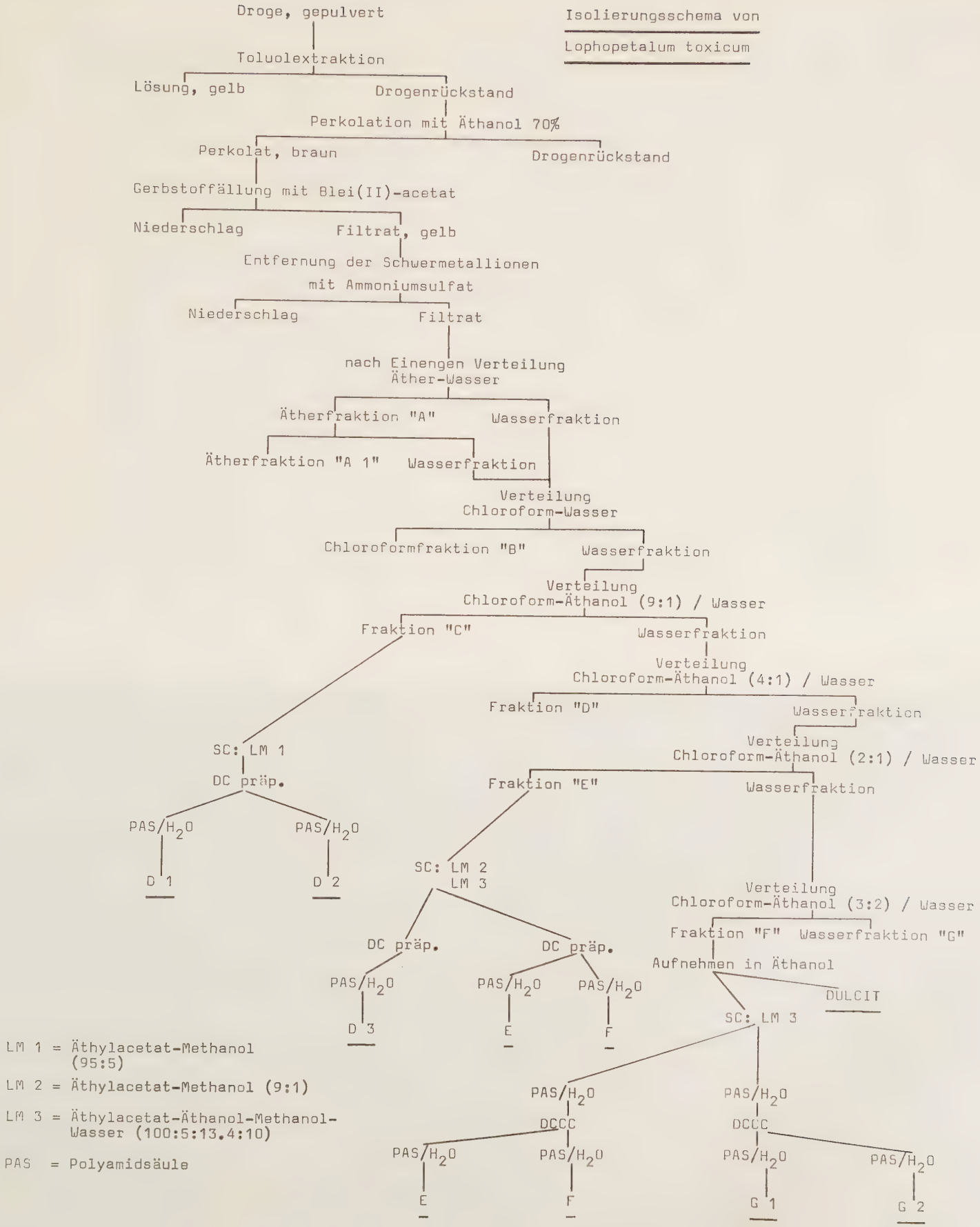


Abb. 10
DC-Übersicht der erhaltenen Fraktionen

Laufmittel: Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10)
Detektion: KEDDE-Reagenz


Isolierungsschema von
Lophopetalum toxicum
Droge, gepulvert
Toluolextraktion
Lösung, gelb
Drogenrückstand
Perkolation mit Äthanol 70%
Perkolat, braun
Drogenrückstand
Gerbstoffällung mit Blei(II)-acetat
Niederschlag
Filtrat, gelb
Entfernung der Schwermetallionen
mit Ammoniumsulfat
Niederschlag
Filtrat
nach Einengen Verteilung
Äther-Wasser
Ätherfraktion "A"
Wasserfraktion
Ätherfraktion "A 1"
Wasserfraktion
Verteilung
Chloroform-Wasser
Chloroformfraktion "B"
Wasserfraktion
Verteilung
Chloroform-Äthanol (9:1) / Wasser
Fraktion "C"
Wasserfraktion
Verteilung
Chloroform-Äthanol (4:1) / Wasser
Fraktion "D"
Wasserfraktion
Verteilung
Chloroform-Äthanol (2:1) / Wasser
Fraktion "E"
Wasserfraktion
SC: LM 1
DC präp.
PAS/H2O
PAS/H2O
D 1
D 2
SC: LM 2
LM 3
Verteilung
Chloroform-Äthanol (3:2) / Wasser
Fraktion "F"
Wasserfraktion "G"
Aufnehmen in Äthanol
DULCIT
DC präp.
DC präp.
PAS/H2O
PAS/H2O
PAS/H2O
D 3
E
F
SC: LM 3
PAS/H2O
PAS/H2O
DCCC
DCCC
PAS/H2O
PAS/H2O
PAS/H2O
PAS/H2O
E
F
G 1
G 2
LM 1 = Äthylacetat-Methanol (95:5)
LM 2 = Äthylacetat-Methanol (9:1)
LM 3 = Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10)
PAS = Polyamidsäule

2.5.2. Isolierung der Glykoside D 1 und D 2

Die Fraktionen "C" und "D" wurden über je eine Kieselgel 60-Säule (Kieselgel für die Dünnschichtchromatographie) chromatographiert. Die Elution erfolgte mit dem Gemisch Äthylacetat-Methanol (95:5). Es wurden insgesamt 72 Fraktionen erhalten.
Die weitere Fraktionierung erfolgte durch präparative DC auf Kieselgelplatten (Schichtdicke 0.5 mm) im Laufmittel Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:13.4:10). Die D 1 bzw. D 2 enthaltenden Zonen wurden mit Chloroform-Äthanol (2:1) eluiert. Das Eindampfen der Lösungen führte zu gelblichen Rückständen, die bei der DC-Überprüfung neben D 1 und D 2 relativ starke lipophile Verunreinigungen aufwiesen. Zur Beseitigung wurden die Substanzen auf Polyamidsäulen mit Wasser eluiert, wobei die gelblichen Bestandteile auf der Säule blieben. Ebenfalls eluierte Polyamidabbauprodukte konnten durch Membranfilter entfernt werden. Die Ausbeute an lyophilisierter Substanz D 1 vom Schmelzpunkt 170 - 174° betrug 28.1 mg. Von D 2 erhielten wir 22.7 mg vom Schmelzpunkt 168 - 175°.

2.5.3. Isolierung der Glykoside D 3, E und F

Fraktion "E" enthielt hauptsächlich die Glykoside D 3, E und F. Die Fraktion wurde aufgeteilt und jede Teilfraktion über Säulen mit Kieselgel 60 für die DC vorgetrennt. Die Elution erfolgte mit den Gemischen Äthylacetat-Methanol (9:1) und anschließend Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10). Die mit D 3 angereicherten Fraktionen wurden ebenfalls präparativ durch Kieselgel-DC (Schichtdicke 0.5 mm) im Laufmittelsystem Chloroform-Äthanol-Methanol-Wasser(7:3:2:1) weiter aufgetrennt, die Zonen im UV_{254} markiert und mit Chloroform-Äthanol (3:2) durch eine G 4-Fritte filtriert. Wie zuvor wurde das Eluat über Polyamid mit Wasser gereinigt, mit Hilfe eines Membranfilters filtriert und gefriergetrocknet.
Von D 3 wurden nur 14.8 mg vom Schmelzpunkt 227 - 230° erhalten.

Die Feintrennung von E und F erfolgte ebenfalls auf Kieselgelplatten im Laufmittelsystem Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10). Der Arbeitsablauf war bis auf die Elution mit Methanol mit dem oben beschriebenen identisch. Wir erhielten 35.3 mg Substanz E vom Schmelzpunkt 187 - 192° und 50 mg Substanz F vom Schmelzpunkt 201 - 205°.

2.5.4. Isolierung der Glykoside E, F, G 1 und G 2

Die aus der Unterphase des Verteilungssystems Chloroform-Äthanol (3:2) und Wasser bestehende Fraktion "F" zeigte auf der DC-Platte einen relativ hohen Anteil stark polarer Begleitsubstanzen, die aus Äthanol ausgefällt wurden. Nach 3 Tagen erfolgte aus der Lösung eine erneute Ausfällung von weißer Substanz, die sich mit dem Dulcit als identisch erwies (Smp., IR). Nach Abtrennung des Dulcits wurde Fraktion "F" im Laufmittelsystem Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) über mehrere Kieselgelsäulen aufgetrennt. Diejenigen Fraktionen, die die Glykoside E, F, G 1 und G 2 bereits weitgehend rein enthielten, wurden über Polyamidsäulen gereinigt.

Durch Zusammenfassung der anderen Fraktionen resultierten zwei Sammelfraktionen mit überwiegend E und F bzw. G 1 und G 2. Aus diesen konnten die Substanzen durch Anwendung der Droplet Counter-Current Chromatographie (DCCC) [32] erhalten werden.

Ein großer Vorteil dieser neuen Variante der Flüssig-Flüssig-Verteilung speziell bei Vorliegen kleiner Substanzmengen ist die hohe Trennleistung für komplex zusammengesetzte hydrophile Substanzgemische.
Bei der Wahl des 2-phasigen Laufmittelsystems waren folgende Kriterien für die Trennung zu beachten: Die Substanzen sollten in der lipophilen Phase dünnschichtchromatographisch trennbar sein und in den Kapillaren müssen Tröpfchen entstehen, was nur empirisch feststellbar ist. Man findet aber in der Literatur bzw. im Geräteprospekt verschiedene erprobte Gemische, die man nach Bedarf abändern kann. Weiter besteht die Möglichkeit, stationäre und mobile Phasen zu tauschen und entsprechend "aufsteigend" oder "absteigend" zu arbeiten.

Die größte Ausbeute an E und G 1 erhielten wir nach der aufsteigenden Methode. Bei der zur Isolierung von F und G 2 verwendeten absteigenden Anordnung erhöhten sich zwar die Laufzeiten und Verdünnung der Substanzen beträchtlich, doch war der Gesamtbedarf an Mobiler Phase gegenüber der präparativen HPLC relativ gering.

Zur Trennung und Isolierung von E und F eignete sich das System Chloroform-n-Propanol-Methanol-Wasser (5:1:6:4). Das Glykosid E wurde vor allem aufsteigend erhalten, während bei F die absteigende Methode erfolgreich war. Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch überprüft und zusammengefaßt. Die Reinigung erfolgte wie üblich über Polyamid mit Wasser, Filtration durch Membranfilter und Lyophilisation.

Aus Phase "F" wurden insgesamt 54 mg E und 50 mg F erhalten.

Die Isolierung von G 1 und G 2 wurde mit Chloroform-n-Propanol-Methanol-Wasser (45:5:70:40) vorgenommen. In der DCCC-Apparatur konnten G 1 aufsteigend und G 2 absteigend getrennt werden. Die Ausbeuten an G 1 lagen bei 35.3 mg, an G 2 bei 27.5 mg. G 1 schmolz zwischen 231 - 235°. Der Schmelzpunkt von G 2 war 215 - 218°.

Tabelle 2: Ausbeuten an Herzglykosiden aus Lophopetalum toxicum

Substanz	Ausbeute in mg	Smp.
D 1	28.1	170 - 174°
D 2	22.7	168 - 175°
D 3	14.8	227 - 230°
E	89.3	187 - 192°
F	100.0	201 - 205°
G 1	35.3	231 - 235°
G 2	27.5	215 - 218°

3. Strukturaufklärungen

3.1. Glykosid D 1

Glykosid D 1 zeigte einen Schmelzpunkt von 170 - 174°. Das in methanolischer Lösung aufgenommene UV-Spektrum wies ein für den β-substituierten Butenolidring in Cardenoliden typisches Hauptmaximum bei 217 nm auf [91]. Bufadienolide-γ-substituierter Cumalinring - absorbieren bei 300 nm. Daneben erschien eine schwach ausgeprägte Schulter bei 262 nm, die auf eine weitere Carbonylfunktion zurückgeführt werden kann. Derartige schwache Absorptionen werden auch für Doppelbindungen beschrieben.

Die Absorptionsbanden im IR-Spektrum bei cm^{-1} 3440 (-OH), 1780 und 1730 (α,β-ungesättigter γ-Lactonring mit freier α-Stellung), 1710 (-CHO) und 1620 (⊃C = C⊂ des Butenolidrings) entsprechen denen vieler Cardenolide. Auf die Glykosidnatur weisen Schwingungsbanden zwischen 1160 und 1030 hin.

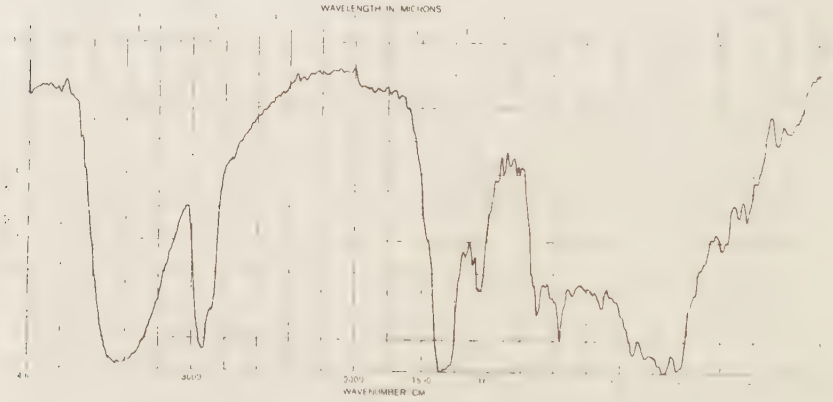


Abb. 11

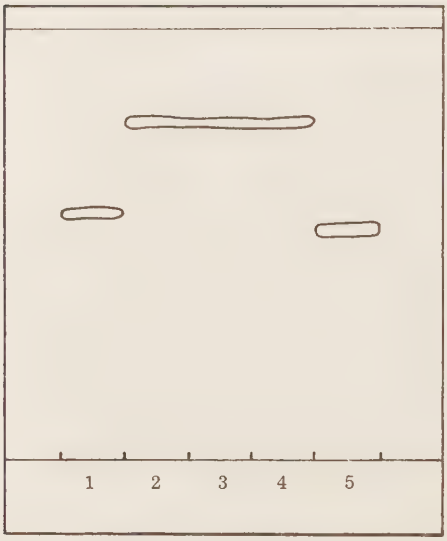
IR-Spektrum von Glykosid D 1

Zur Gewinnung der Aglykone werden Herzglykoside durch Säuren oder enzymatisch gespalten. Nur bei Vorliegen elaeodendrosid-ähnlicher Strukturen ist eine Hydrolyse nicht möglich [33].

Die Geschwindigkeit der Säurehydrolyse ist abhängig von der Art des an C-3 des Aglykons gebundenen Zuckers: 2-Desoxyhexosen sind leicht abspaltbar, 6-Desoxyhexosen (= Hexamethylosen) und ihre Methyläther (z.B. Thevetose, Acofriose, Digitalose) erfordern dagegen ebenso wie Glucose Bedingungen, die oft zur Veränderung oder Zerstörung des Aglykons führen, während die Zucker meist unverändert erhalten bleiben 93). KILIANI 34) versuchte die Hydrolyse mit einer Mischung aus Eisessig (35 ml), Wasser (55 ml) und konzentrierter Salzsäure (10 ml) und einer Hydrolysezeit von 1 Stde.. Die Behandlung von Convallatoxin mit dem Säuregemisch liefert hiermit ein Gemisch, in dem k-Strophanthidin nur in geringem Maß vorhanden ist. Schonender ist die Hydrolyse nach MANNICH und SIEWERT 35), bei der das Glykosid mit einer 1%igen Lösung von HCl in Aceton versetzt un im Dunklen bis zu 38 Tage lang bei 20° stehengelassen wird. Diese Hydrolyse wurde von REICHSTEIN 36) auch mit kleinen Substanzmengen durchgeführt. Aber auch hierbei ergab Convallatoxin neben k-Strophanthidin mehrere andere Produkte, vermutlich Anhydroverbindungen. Weitere modifizierte Hydrolysen werden beschrieben.

Eine von uns probeweise durchgeführte 30minütige Hydrolyse von Convallatoxin mit 2N-Trifluoressigsäure [94] unter Rückfluß ergab einen hohen Anteil an Aglykon neben anderen Produkten und nicht hydrolysiertem Glykosid.

D 1 war damit ebenso schwer hydrolysierbar wie Convallatoxin. Es mußte daher ein Glykosid mit einem 2-Hydroxyzucker vorliegen. Chromatographisch erwies sich das Aglykon mit k-Strophanthidin als identisch.



1 = D 1
2 = Hydrolysat von D 1
3 = k-Strophanthidin
4 = Hydrolysat von Convallatoxin
5 = Convallatoxin

Laufmittelsystem:
Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10)
(Kieselgel)
Detektion: 1. UV 256 nm
2. KEDDE
3. H_2SO_4 120°, 10 Min.

Abb. 12
DC-Vergleich der Hydrolysate von Glykosid D_1 und Convallatoxin mit k-Strophanthidin

Als brauchbare Hydrolysemethode im Mikromaßstab für den Zuckernachweis in Glykosiden erwies sich ein Verfahren von KARTNIG [37], bei dem Glykoside auf der Kieselgelplatte einem Salzsäuredampf ausgesetzt werden. Die Platten werden so abgedeckt, daß nur die Flecken der aufgetragenen Glykoside und die Vergleichszucker mit der Salzsäure in Berührung kommen. Nach gründlichem Entfernen des Salzsäuredampfes erreichten wir bei Einsatz von nur 10 µg Glykosid und nachfolgende Trennung im Laufmittelsystem Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) einen einwandfreien Zuckernachweis.

Ein DC-Vergleich des Hydrolysats mit den zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Zuckern zeigte ähnliches Laufverhalten und gleiche Anfärbung des D 1-Zuckers wie Rhamnose, Fucose bzw. Gulomethylose.

Ein Vergleich mit Literatur-R_f-Werten deutete auf 6-Desoxyallose als möglicher Zuckerkomponente.

Eine Bestätigung der Struktur des k-Strophanthidins und die exakte Identifizierung des Zuckers gelang durch massenspektroskopische Untersuchungen.

Polare Herzglykoside neigen dazu, sich bei den hohen bei der Elektronenstoß-MS (EI-MS) zur Verdampfung der Probe eingesetzten Temperaturen zu zersetzen. Man kann entweder Hydroxylgruppen derivatisieren (z.B. acetylieren, methylieren, trimethylsilylieren), was mehr Substanz benötigt, oder anstelle von EI-MS z.B. die Felddesorptions-MS (FD-MS) verwenden. Bei dieser Methode wird die Probe auf die Anode (= Emitter) aufgetragen und durch Anlegen eines hohen elektrischen Feldes (ca. 8 kV) aus dem festen Zustand in positive Ionen dissoziiert und diese von der Anode desorbiert. Diese Methode bietet sich speziell bei Mikromengen an. Je polarer die Moleküle, desto stärker muß der Emitter aufgeheizt werden. Ein Heizstrom der Anode von 20 - 30 mA entspricht ca. 40° (BAT = best anode temperature). Die Registrierung der Ionen bei EI- und FD-Technik ist identisch. Die geringere Fragmentierung beim FD-MS im Vergleich zum EI-MS läßt sich durch Erhöhung der Anodentemperatur über BAT hinaus verbessern 65). Die Abbildung gibt eine Gegenüberstellung der Spektren von D 1 für t = 0, t > BAT und t = BAT.

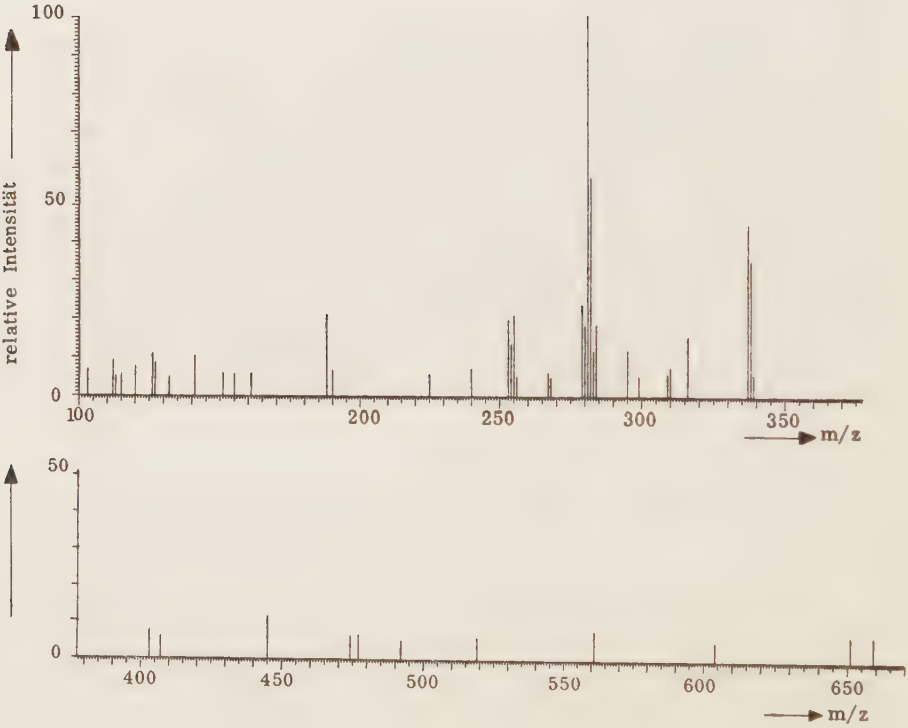


Abb. 13
Felddesorptions-Massenspektrum von Glykosid D 1
Aufnahme ohne Heizstrom
(t = 0)

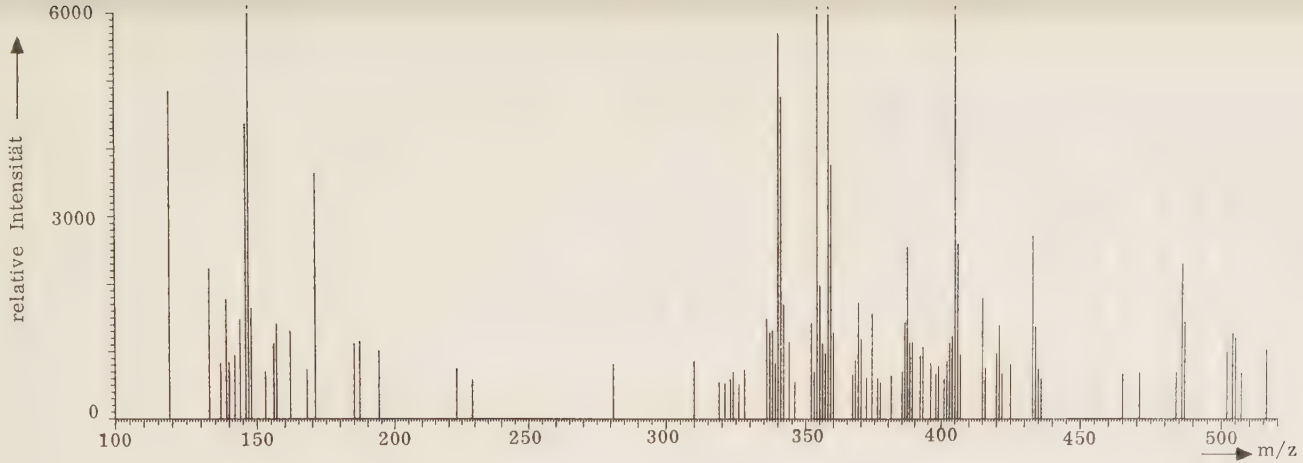


Abb. 14: FD-MS von Glykosid D 1, Heizstrom 30 - 35 mA (t > BAT)

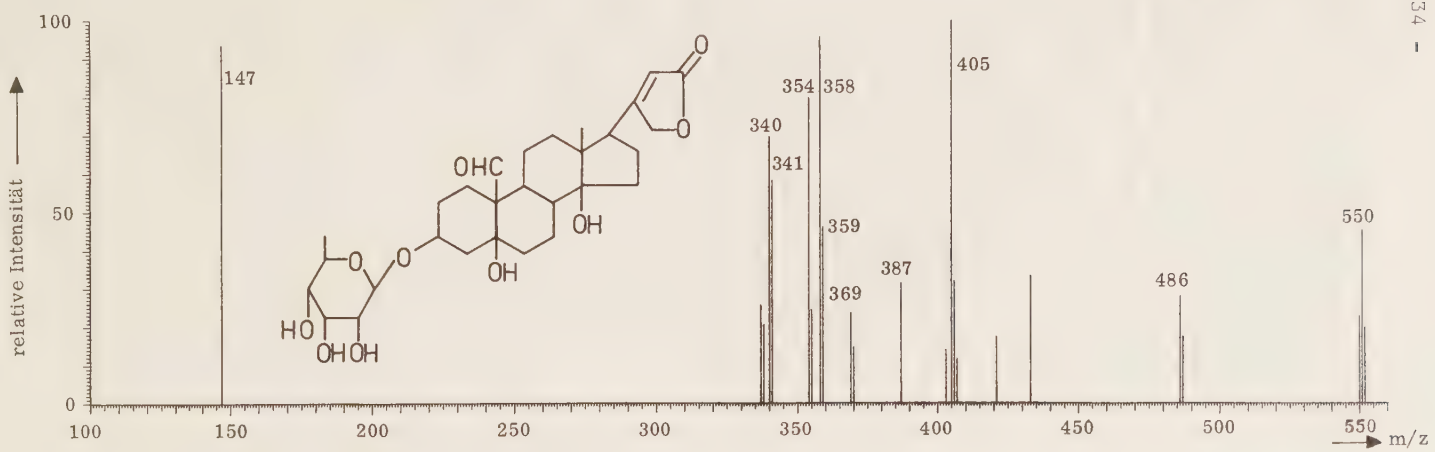


Abb. 15: FD-MS von Glykosid D 1, Heizstrom 20 - 25 mA (t = BAT)

Basispeak im FD-MS von D 1 ist der $[(M + H) - Z]^+$-Peak bei m/z 405. Die Massendifferenz von 146 zwischen dem $[M + H]^+$-Peak bei m/z 551 mit 45% relativer Intensität und dem Basispeak, und der $[Z + H]^+$-Peak bei m/z 147 mit einer rel.Int. von 93% bewiesen das Vorliegen einer Desoxyhexose. Bei D 1 handelt es sich demnach um ein Monoglykosid. Zugleich konnte die Anwesenheit eines weiteren Nicht-Desoxyzuckers ausgeschlossen werden.

In der folgenden Tabelle sind die m/z-Werte den Fragmentionen zugeordnet:

Tabelle 3: Zuordnungen im FD-MS von Glykosid D 1

Ionen	m/z
$[M + H]^+$	551
$[M]^+$	550
$[M - 2H_2O - CO]^+$	486
$[(M + H) - Z]^+$	405
$[(M + H) - Z - H_2O]^+$	387
$[(M + H) - Z - 2H_2O]^+$	369
$[(M + H) - Z - H_2O - CO]^+$	359
$[M - Z - H_2O - CO]^+$	358
$[(M + H) - Z - 2H_2O - CH_3]^+$	354
$[(M + H) - Z - 2H_2O - CO]^+$	341
$[M - Z - 2H_2O - CO]^+$	340
$[Z + H]^+$	147

(Z = Zucker - H_2O)

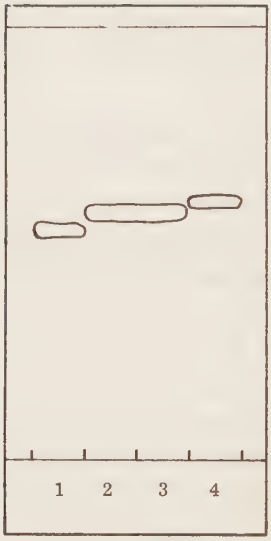
Bei polaren Herzglykosiden sind Massendifferenzen von 15, 18 und 28 oder mehrfache davon auf die Abspaltungen von CH_3-, H_2O- und CO-Fragmenten zurückzuführen [106].

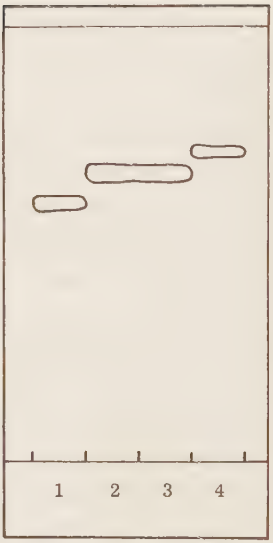
Ein zum Vergleich aufgenommenes FD-MS von Convallatoxin (MG = 550.66) wies ebenfalls Peaks bei m/z 551, 405, 340 und 147 auf (Spektrum siehe Allg.Teil 4.1., S. 92).

Die Unterschiede zwischen beiden bestehen offensichtlich nur im Zuckeranteil. Bei dem D 1-Zucker mußte es sich um eine der 8 möglichen diastereoisomeren 6-Desoxyhexosen handeln.
Zu vergleichen war D 1 zunächst mit folgenden bekannten 6-Desoxyhexosiden des k-Strophanthidins:

k-Strophanthidin	+	6-Desoxymannose	(Convallatoxin)
k-Strophanthidin	+	6-Desoxyallose	(Strophallosid)
k-Strophanthidin	+	6-Desoxygalactose	(Strophantidinfucosid[95])
k-Strophanthidin	+	6-Desoxyglucose	(Des[gluco]cheirotoxin)

Für Vergleichszwecke standen Convallatoxin, Descheirotoxin und Strophallosid zur Verfügung. Beim DC- und HPLC-Vergleich ergaben D 1 und Strophallosid identisches Laufverhalten bzw. Retention. Auch das Färbeverhalten war gleich.





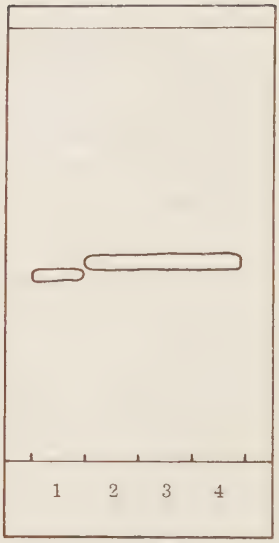


Abb. 16 Abb. 17 Abb. 18

DC-Vergleiche von Monosiden des k-Strophanthidins

1 = Convallatoxin
2 = D 1
3 = Strophallosid
4 = Descheirotoxin

zu Abb. 16 - Laufmittelsystem: Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) (Kieselgel)

Detektion: 1. UV 256 nm
2. H_2SO_4, 120°, 10 Min.
Farbentwicklung: UV 366 nm grün
VIS gelbgrün

zu Abb. 17 - Laufmittelsystem: Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3) (Kieselgel)

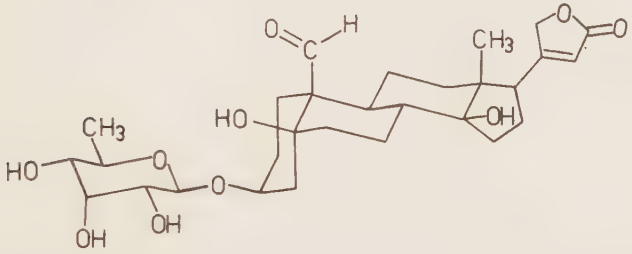
Detektion: 1. UV 256 nm
2. $SbCl_3/CHCl_3$, 120°, 10 Min.
Farbentwicklung: UV 366 nm gelbgrün
VIS graugrün

zu Abb. 18 - Laufmittelsystem: Äthylacetat-Pyridin-Wasser (5:1:4) (Oberphase, Kieselgel)

Detektion: 1. UV 256 nm
2. KEDDE

Die durch Hydrolyse von Strophallosid gewonnene 6-Desoxyallose war chromatographisch nicht von dem D 1-Zucker zu unterscheiden. Die endgültige Identifizierung gelang am Zuckeranalysator durch Vergleich der relativen Retentionszeit mit denen der anderen sieben 6-Desoxyhexosen (-altrose, -galactose, -glucose, -gulose, -idose, -mannose, -talose). Die Trennung dieser Zucker ist im Allg.Teil 4.2., S. 98, beschrieben.

Strophallosid = Strophanthidin-3-β-O-β-6-desoxy-D-allopyranosid wurde bisher aus Strebus asper LOUR [38], Antiaris toxicaria LESCH [39], Mansonia altissima A.CHEV. [40] und Convallaria majalis L. [41] isoliert. In der Literatur werden verschiedene Schmelzbereiche angegeben: 163 - 165° oder 183 - 186° und 177 - 181°. Die uns von Herrn Prof.Reichstein zugesandte Probe war mit einem Schmelzbereich von 162 - 165° deklariert. Die authentische Probe ergab mit D 1 keine Depression. Die IR-Spektren von D 1 und Strophallosid waren deckungsgleich.



$C_{29}H_{42}O_{10}$ MG 550.66

Mit Strophallosid wurde das erste Strophanthidinglykosid aus einem Vertreter der Celastraceenfamilie isoliert.

3.2. Glykosid D 2

3.2.1. Strukturaufklärung des isolierten Glykosids

Glykosid D 2 vom Smp. = 168 - 175° wies eine etwas höhere Polarität als D 1 auf. Das für Cardenolide typische Absorptionsmaximum im UV-Spektrum lag bei 217 nm. Auch das IR-Spektrum zeigte, verglichen mit dem von D 1, nur geringfügige Unterschiede.

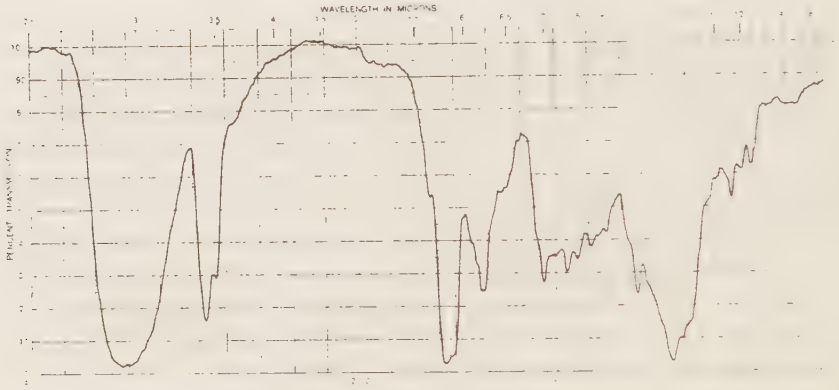


Abb. 19
IR-Spektrum von Glykosid D 2 (isoliert)

D 2 zeigte mit Strophallosid, Descheirotoxin und Convallatoxin gleiches Färbeverhalten, aber eine von diesen verschiedene Laufhöhe. Die Vermutung, es könnte sich auch bei D 2 um ein Strophanthidinglykosid handeln, wurde durch die Hydrolyse mit 2N-Trifluoressigsäure und DC-Vergleich des Hydrolysats mit einer authentischen k-Strophanthidin-Probe erhärtet. Im Zuckerlaufmittelsystem Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) war der D 2-Zucker nicht von Rhamnose zu unterscheiden. In der Literatur werden für Rhamnose und Chinovose nahezu gleiche R_f-Werte angegeben [96,97,98]. Fucose weist als einzige

6-Desoxyhexose auf Kieselgelplatten eine deutlich niedrigere Laufhöhe als Rhamnose und Chinovose auf. Eine Identität von D 2 mit Strophanthidinfucosid schied daher aus.

Wir stellten L-Chinovose durch Epimerisierung von L-Rhamnose nach BILIK, VOELTER und BAYER [42] und D-Chinovose durch Hydrolyse von Orizabin-Säure [43] her. Auf mit Dinatriummonohydrogenphosphat imprägnierten Kieselgelfertigplatten [44] waren im Laufmittelsystem Aceton-Chloroform-Methanol-Wasser (10:2:4:1) Rhamnose und Chinovose gut trennbar ($R_{f\ Rha}$ = 0.72, $R_{f\ Chino}$ = 0.64).

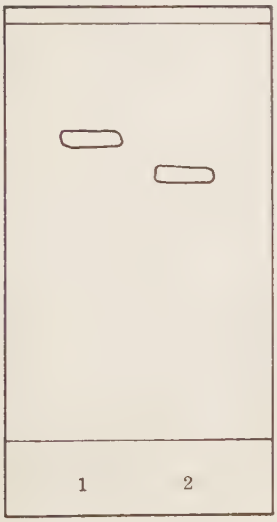


Abb. 20
DC-Trennung von Rhamnose und Chinovose

Laufmittelsystem:
Aceton-Chloroform-Methanol-Wasser (10:2:4:1)
Kieselgelplatte imprägniert mit 0.3 M - Na_2HPO_4-Lsg.

Detektion:
Anilin-Diphenylamin-Reagenz, 120°, 10 Min.

Farbentwicklung:
anfangs grünlichbraun, später blau

1 = Rhamnose
2 = Chinovose

Der D 2-Zucker war in diesem Laufmittel identisch mit Chinovose. Die relative Retention des D 2-Zuckers war am Zuckeranalysator mit der der Chinovose identisch.

Das FD-MS zeigte den Basispeak $[M + {}^{23}Na]^+$ bei m/z 573 und die Massendifferenz von 146 als Beweis für die Desoxyhexose. Auf die Besonderheit der Alkalianlagerung wird in einem eigenem Kapitel eingegangen (siehe Allg.Teil 4.1., S. 91).

Die wesentlichen Zuordnungen im FD-MS von D 2 sind:

Tabelle 4: Zuordnungen im FD-MS von Glykosid D 2 (isoliert)

Ionen	m/z
$[M + {}^{39}K]^+$	589
$[M + {}^{23}Na]^+$	573
$[M + H]^+$	551
$[(M + {}^{23}Na) - CO]^+$	545
$[(M + {}^{39}K) - Z]^+$	443
$[(M + H) - Z - H_2O - CO]^+$	359

(Z = Desoxyhexose - H_2O)

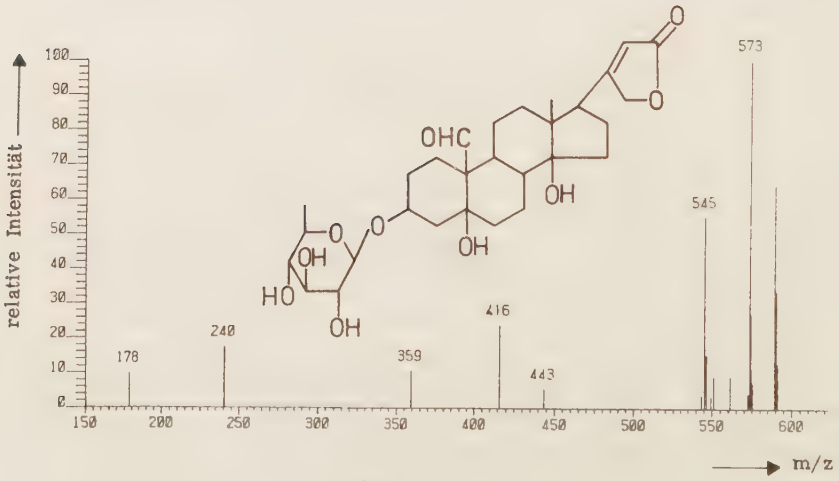


Abb. 21

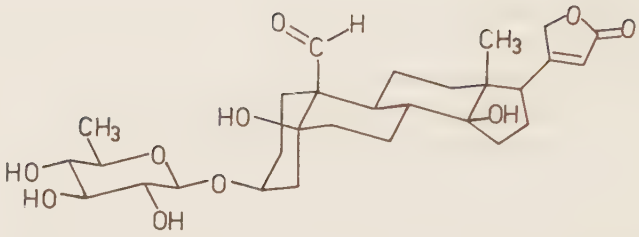
FD-MS von Glykosid D 2 (isoliert) bei 27 - 30 mA

Nach KAISER[45] kann die Chinovose in den einzigen bisher in der Natur gefundenen chinovose-haltigen Cardenolidglykosiden Digitoxigeninchinovosid und Digitoxigeninglucochinovosid ebenso wie eine endständige Glucose durch Glucosidasen oder glucosidasehaltige Präparationen abgespalten werden. Durch den frisch bereiteten Hepatopankreassaft der Weinbergschnecke (Helix pomatica [99]) war das Monoglykosid D 2 nach 24 Stdn. bei 40°C glatt spaltbar. Ein weiterer Versuch mit reiner β-Glucosidase aus Süßmandeln (Fa.SERVA) führte zu dem gleichen Ergebnis, so daß eine β-Verknüpfung von Aglykon und Zucker wahrscheinlich war. Die auf D 2 angewandte KLYNE-Regel (siehe unter Glykosid E, Allg.Teil 3.4., S. 54) zeigte das Vorliegen einer β-verknüpften D-Chinovose, da die Differenz aus den $[M]_D$-Werten von +178° für k-Strophanthidin [105] und +48° für D 2 ($[\alpha]_D^{26°}$ = +8.7°) -130° beträgt. Die theoretischen $[M]_D$-Werte lauten [130]:

Methylzucker	D	L
Methyl-α-chinovosid	+263°	-263°
Methyl-β-chinovosid	-98°	+98°

Der Beweis für die β-Konfiguration wurde durch die Kopplungskonstante J = 7.8 Hz des Dubletts bei δ = 4.3 und 4.9 ppm im ^{1}H-NMR-Spektrum von D 2 bewiesen.

Bei D 2 handelt es sich demnach um ein bisher nicht bekanntes Strophanthidin-3-β-O-β-6-desoxy-D-glucopyranosid oder Strophanthidin-3-O-β-D-chinovosid.



$C_{29}H_{42}O_{10}$ MG 550.66 $[\alpha]_D^{26^o} = +8.7^o$

Der endgültige Strukturbeweis gelang durch eine Partialsynthese aus Aglykon und α-Acetobromchinovose.

3.2.2. Synthese von Strophanthidinchinovosid

Die Umsetzung erfolgte nach der von HARTENSTEIN und SATZINGER [46] modifizierten königs-Knorr-Synthese in Dichloräthan mit FETIZON-Reagenz [47] als Katalysator. Das aus k-Strophanthidin und α-Acetobromchinovose gebildete k-Strophanthidin-3-O-β-6-desoxy-D-glucopyranosid-triacetat vom Smp. = 266 - 267° ergab nach der Hydrolyse mit methanolischem Ammoniak und Reinigung über eine Kieselgelsäule (Kieselgel für die DC) mit Dichlormethan-Methanol (85:15) Kristalle vom Smp. 170 - 178°.

Das FD-MS der synthetischen Verbindung zeigte neben den vom natürlichen D 2 her bekannten Peaks auch den Desoxyhexosenpeak $[Z + H]^+$ bei m/z 147.

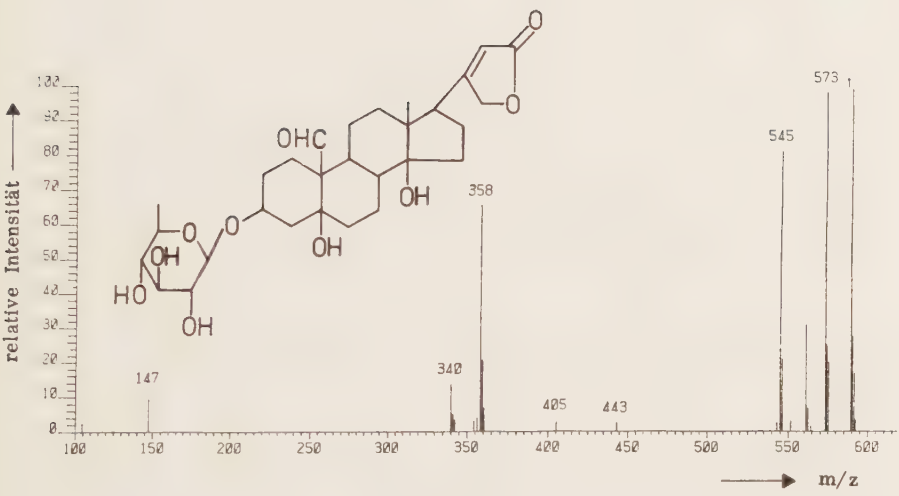


Abb. 22
FD-MS von synthetisiertem Strophanthidinchinovosid

Synthetisiertes und isoliertes Strophanthidinchinovosid ergaben im Mischschmelzpunkt keine Schmelzpunktsdepression. DC-Laufverhalten in verschiedenen Laufmitteln und Anfärbung mit Reagenzien waren ebenso wie HPLC-Retention (siehe Allg. Teil 4.3.2., S.103) und IR-Spektrum identisch.

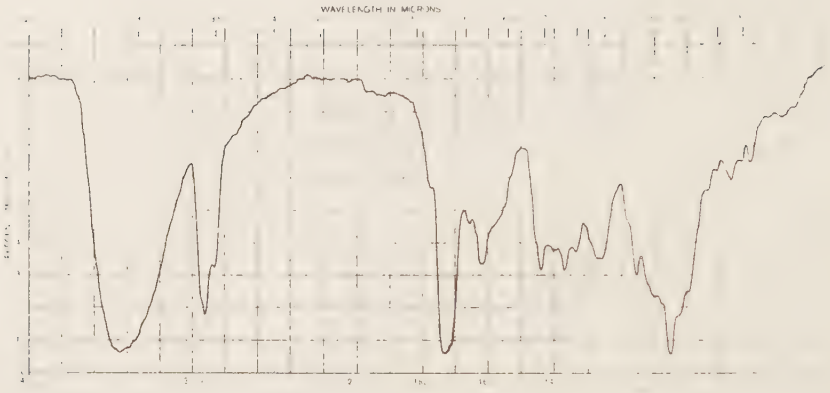


Abb. 23
IR-Spektrum von synthetisiertem Strophanthidinchinovosid

3.3. Glykosid D 3

Glykosid D 3 vom Smp. = 227 - 230° hatte ein UV-Absorptionsmaximum von 217 nm. Die Banden des IR-Spektrums unterschieden sich nur unwesentlich von denen der anderen Cardenolidglykoside.

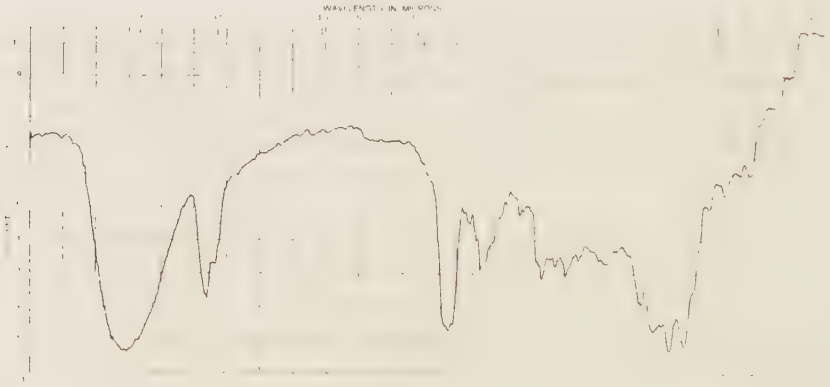


Abb. 24
IR-Spektrum von Glykosid D 3

Aus dem $[M + H]^+$-Peak im FD-MS bei m/z 567, dem $[Z + H]^+$-Peak bei m/z 147 sowie der Massendifferenz von 146 zwischem dem $[M + H]^+$- und $[(M + H) - Z]^+$-Peak und den anderen charakteristischen Fragmenten war wieder die Anwesenheit einer Desoxyhexose abzuleiten. Das Aglykon sollte sich wegen des um 16 höheren Molekulargewichtes von k-Strophanthidin nur durch eine zusätzliche OH-Gruppe unterscheiden.

Tabelle 5: Zuordnungen im FD-MS von Glykosid D 3

Ionen	m/z
$[M + Na]^+$	589
$[M + H]^+$	567
$[M]^+$	566
$[M - CO]^+$	538
$[(M + H) - Z]^+$	421
$[M - Z]^+$	420
$[M - Z - H_2O]^+$	412
$[M - Z - H_2O - CO]^+$	374
$[M - Z - 2H_2O - CO]^+$	356
$[Z + H]^+$	147
$[Z - H_2O]^+$	128
$[Z - 2H_2O]^+$	110
$[Z - C_2H_5O - H_2O]^+$	84

(Z = Desoxyhexose - H_2O)

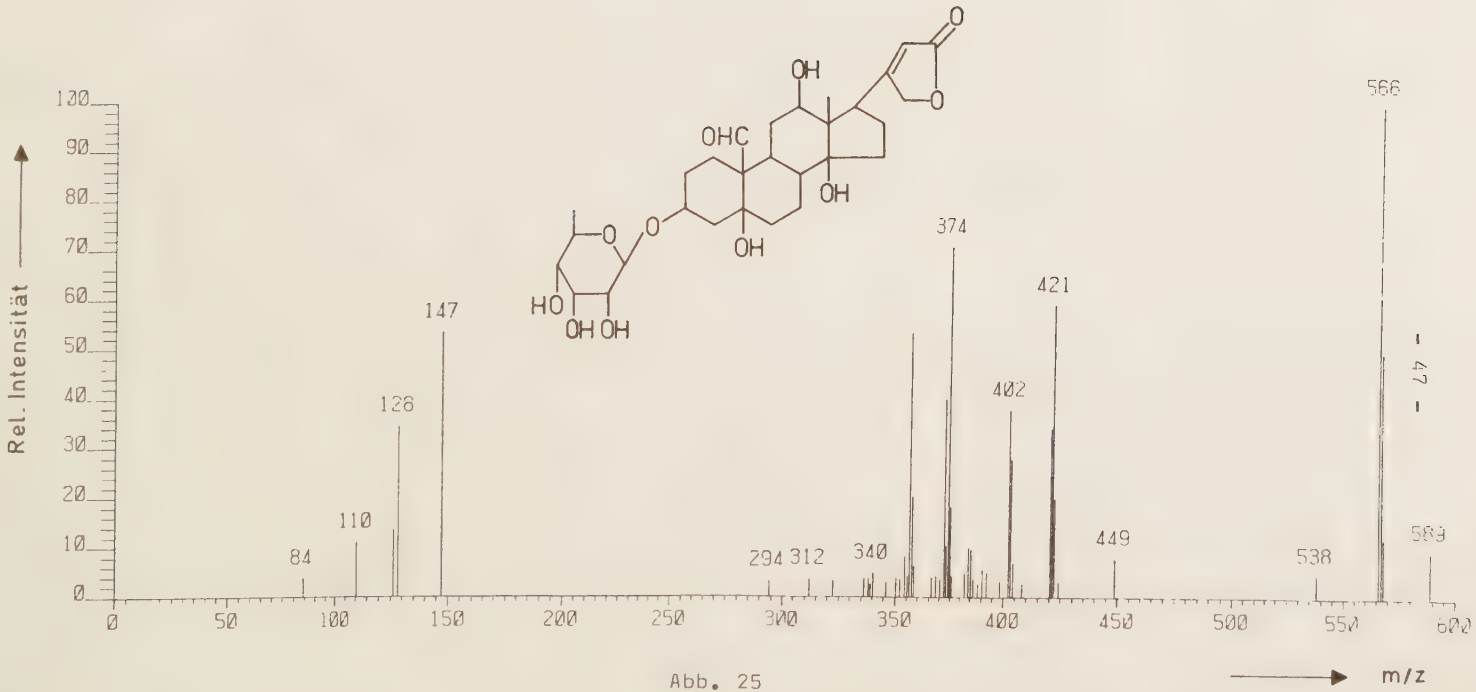


Abb. 25

FD-MS von Glykosid D 3 bei 25 mA

Die gelbe Farbe des Glykosides nach Besprühen mit 85%iger Schwefelsäure war ein Hinweis auf das Vorliegen einer 6-Desoxyhexose. Die Identifizierung der 6-Desoxyallose gelang dünnschichtchromatographisch und durch Vergleich der relativen Retentionen am Zuckeranalysator (siehe Allg.Teil 4.2., S. 96).

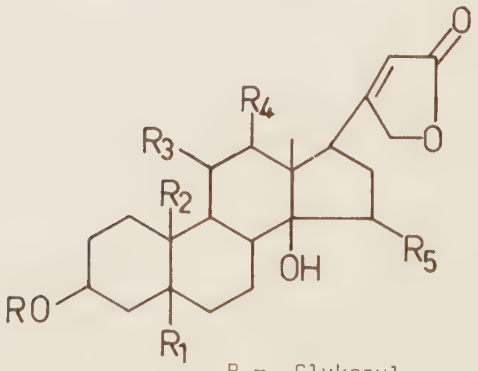
D 3 ergab einen nur kurzzeitig nach der KEDDE-Detektion erkennbaren rotvioletten Farbton, während sich D 1 und D 2 blauviolett anfärbten.

Da die Reaktion mit alkalischer 3,5-Dinitrobenzoesäure auf den Butenolidring zurückgeführt wird, schien es naheliegend, daß geringfügige Farbverschiebungen durch sterisch eng benachbarte Gruppierungen verursacht werden könnten. Als Substituenten in der Nähe des Butenolidrings sind Hydroxygruppen in C-16-, C-12- und C-11-Stellung bekannt. Es zeigte sich bei den untersuchten Cardenoliden, daß eine C-16-OH-Gruppe die blauviolette KEDDE-Farbe nicht beeinflußt, während C-12-als auch C-11-OH-Gruppen den Farbton nach rotviolett hin verschieben. Der von KAISER 48) nach JENSEN 28) modifizierte Fluoreszenztest mit Chloramin/Trichloressigsäure gibt einen Hinweis auf das Vorhandensein einer OH-Gruppe in C-12: Die Feststellung, daß Cardenolide mit dieser Gruppe blau oder blaugrün, solche ohne diese meist gelb fluoreszieren, konnte bestätigt werden. Sarmentosid A und Bipindosid mit einer OH-Gruppe in C-11-Stellung färbten sich gelbgrün.

Mit diesem Reagenz gaben die Glykoside D 3, D 4, G 1 und G 2 Fluoreszenzen wie die 12-Hydroxy-k-Strophanthidin=Antiarigeninglykoside Antiallosid und β-Antiarin.

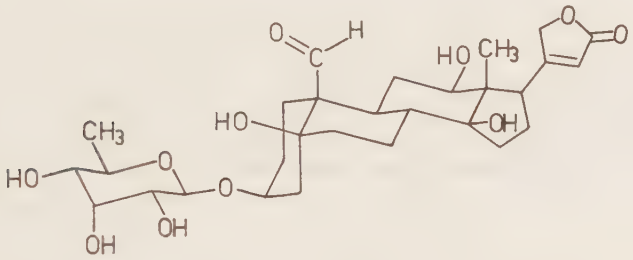
Tabelle 6: Übersicht über charakteristische Färbungen mit den Reagenzien nach KEDDE und JENSEN/KAISER

Substanz	Struktur					KEDDE		JENSEN
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	blau-violett	rot-violett	Fluoreszenzfarben
Adonitoxin	-H	-CHO	-H	-H	-OH	+		blau
Lanatosid A	-H	$-CH_3$	-H	-H	-H	blau		gelb
Lanatosid B	-H	$-CH_3$	-H	-H	-OH	+		innen blau außen weißlichblau
Lanatosid C	-H	$-CH_3$	-H	-OH	-H		+	innen dunkelblau, außen bläulich
Sarmentosid A	-OH	-CHO	-OH	-H	-H		+	gelbgrün
Bipindosid	-OH	$-CH_3$	-OH	-H	-H		+	gelbgrün
Antiallosid	-OH	-CHO	-H	-OH	-H		+	blau
β-Antiarin	-OH	-CHO	-H	-OH	-H		+	blau
Convallatoxin	-OH	-CHO	-H	-H	-H	+		gelbgrün
Convallatoxol	-OH	$-CH_3O$	-H	-H	-H	+		gelbgrün
Lophopetalumglykoside D 1, D 2, E und F						+		gelb-gelbgrün
Lophopetalumglykoside D 3, D 4, G 1 und G 2							+	blau



R = -Glykosyl

D 3 hatte in den benutzten Laufmittelsystemen den gleichen R_f-Wert wie Antiallosid. Die Hydrolyse mit Trifluoressigsäure führte zum gleichen Aglykon, nämlich Antiarigenin. Diese Ergebnisse bewiesen zusammen mit IR-Spektren, Mischschmelzpunkt und gleichem Retentionsverhalten in der HPLC die Identität von D 3 mit dem Antiarigenin-3-β-D-β-6-desoxy-D-allopyranosid, dem Antiallosid. Dieses ist bisher nur einmal von REICHSTEIN aus dem Samen von Antiaris toxicaria LESCH [38] isoliert worden. Der Baum führt einen Milchsaft, der ebenso wie die Rinde von Lophopetalum toxicum als Pfeilgift verwendet wurde.



$C_{29}H_{42}O_{11}$ MG 566.66

3.4. Glykosid E

Glykosid E vom Smp. = 187 - 192° hatte wieder das für Cardenolide typische UV-Absorptionsmaximum bei 217 nm und die üblichen IR-Banden.

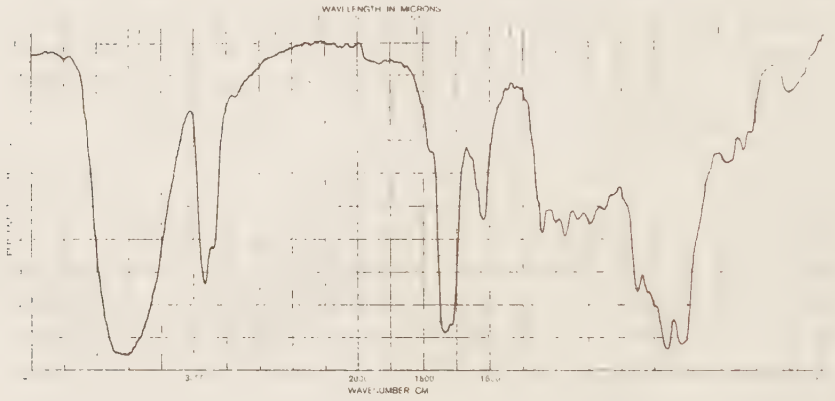


Abb. 26
IR-Spektrum von Glykosid E

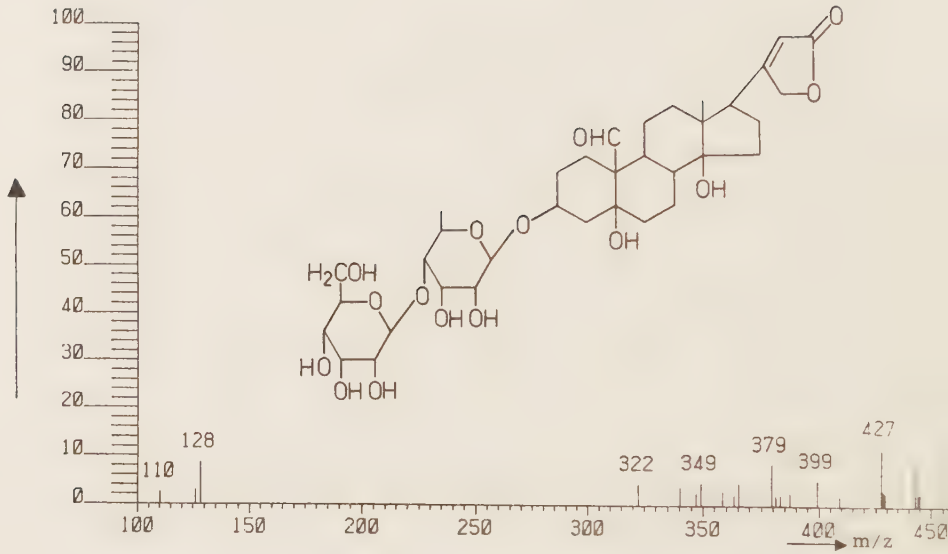
Der Drehwert betrug +7.63°. Glykosid E gab mit 85%iger Schwefelsäure, Vanillin/Schwefelsäure, Chloramin/Trichloressigsäure, Antimon-(III)-chlorid/Chloroform und Xanthydrol die gleichen Farbreaktionen wie D 1 und D 2. Die gelbe Schwefelsäurefarbe legte die Vermutung nahe, daß auch Glykosid E eine 6-Desoxyhexose enthalten könnte. Das Laufverhalten sprach allerdings für die Anwesenheit von mindestens 2 Molekülen Zucker. 6-Desoxyallose als ein Zuckerbestandteil konnte durch Mikrohydrolyse auf der DC-Platte und am Zuckeranalysator bewiesen werden. Als Hexose kamen nach ZA-Analyse Allose, Talose oder Galactose in Betracht, da alle drei identische Peaks ergaben (siehe Allg. Teil 4.2., S. 96). Im DC konnte Allose auf Grund ihres R_f-Wertes zwischen Galactose und Talose identifiziert werden. Dieser

Befund wurde später durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie bestätigt. Das Fluoreszenzverhalten nach Schwefelsäurebehandlung deutete wieder auf k-Strophanthidin als Aglykon hin. Dünnschichtchromatographisch konnten im Säurehydrolysat von E Strophallosid und k-Strophanthidin leicht identifiziert werden. Enzymatische Abbauversuche mit Schneckenenzym, α- und β-Glucosidase führten zu keinem Ergebnis. Im FD-MS war die Hexose durch die Massendifferenz 162, die Desoxyhexose durch die Differenz 146 und den $[Z - H_2O]^+$-Peak bei m/z 128 charakterisierbar. $[M + Na]^+$- und $[M + K]^+$-Peaks wiesen Glykosid E erneut als Diglykosid aus. Die k-Strophanthidinstruktur konnte im MS nach Zuckerabspaltung durch die entsprechenden Signale bei m/z 443 und 427 sowie einige weitere Fragmente identifiziert werden.

Tabelle 7: Zuordnungen im FD-MS von Glykosid E

Ionen	m/z
$[M + K]^+$	751
$[M + Na]^+$	735
$[(M + K) - CO]^+$	723
$[(M + Na) - CO]^+$	707
$[M - CO]^+$	689
$[(M + K) - Z']^+$	589
$[(M + Na) - Z']^+$	573
$[(M + Na) - Z' - CO]^+$	545
$[(M + Na) - Z' - CO - H_2O]^+$	527
$[(M + K) - Z' - Z]^+$	443
$[(M + Na) - Z' - Z]^+$	427
$[(M + Na) - Z' - Z - H_2O]^+$	409
$[(M + Na) - Z' - Z - CO]^+$	399
$[M + 2\ Na]^{2+}$	379
$[Z - H_2O]^+$	128
$[Z - 2\ H_2O]^+$	110

(Z = Desoxyhexose-H_2O
Z'= Hexose-H_2O)



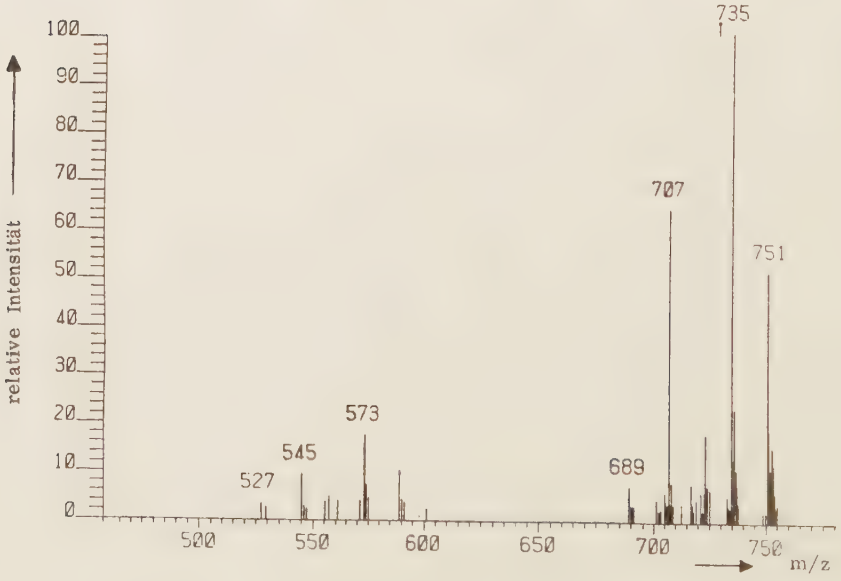


Abb. 27

FD-MS von Glykosid E bei 32 mA

Glykosid E stellt damit ein Strophanthidindiglykosid mit der in Herzglykosiden bisher noch nie aufgefundenen Zuckerkombination 6-Desoxyallose und Allose dar. Wie üblich war der Desoxyzucker an C-3 des Aglykons gebunden (Reihenfolge der Abspaltung im FD-MS, chromatographische Identität des Hydrolyseprodukts von Glykosid E mit Strophallosid).

Auf der Basis der Arbeiten von HUDSON [49], der empirisch Zusammenhänge zwischen spezifischen Drehwerten und der Konfiguration von Zuckern erkannte, formulierte KLYNE 50) die Regel, wonach die molekulare Drehung $[M]_D$ + eines Glykosids mit einem optisch aktiven Aglykon näherungsweise gleich ist der Summe der molekularen Drehungen des Aglykons und des Methyl-α- oder Methyl-β-glykosids des oder der Zucker. Die theoretischen Berechnungen über Enantiomerie und Konfiguration stimmen bei Mono-und auch bei Diglykosiden meist relativ genau mit den gemessenen Werten überein.

Die Anwendung der KLYNE-Regel zur Festlegung der Konfiguration und Enantiomerie bestätigte Strophallosid als Monosid mit β-verknüpfter 6-Desoxy-D-allose. Allose lag ebenfalls in der β-D-Form vor, da die Differenz aus den molekularen Drehungen von Glykosid E ($[M]_D = +50^\circ$) und k-Strophanthidin ($[M]_D = +178^\circ$) [105] für die beiden Zucker -128° betrug.

Die theoretischen $[M]_D$-Werte demgegenüber sind:

Methylzucker	D	L
Methyl-α-allopyranosid [51]	$+277^\circ$	-277°
Methyl-β-allopyranosid [51]	-99°	$+99^\circ$
Methyl-α-6-Desoxyallopyranosid [52]	$+96^\circ$	-96°
Methyl-β-6-Desoxyallopyranosid [52]	-109°	$+109^\circ$

Der theoretischen Berechnung zufolge sollten die beiden Zucker zusammen eine Drehung von -208° bewirken. Die Abweichung von 80° gegenüber dem gefundenen Wert von -128° ist nach Literaturangaben [141] nicht außergewöhnlich hoch.

+ $[M]_D = \frac{[\alpha]_D \cdot MG}{100}$

Die ^{13}C-NMR-Spektroskopie sollte die Identität des Aglykons bestätigen und die Verknüpfungsweise der Allose und 6-Desoxyallose klären. Damit entfielen die umständlichen und langwierigen Identifizierungsverfahren, wie z.B. Derivatbildung, Oxidationsverfahren und Hydrolysierbarkeit mit Enzymen [100,142].

Die Literatur-^{13}C-NMR-Verschiebungen für Herzglykoside bzw. Zucker sind wegen der verschiedenen verwendeten Lösungsmittel ($Chloroform_{d-1}$, $Pyridin_{d-5}$, $Dimethylsulfoxid_{d-6}$, $Wasser_{d-2}$) und Referenzstoffe (Tetramethylsilan, p-Dioxan, Schwefelkohlenstoff) mit Abweichungen um 1 - 2 ppm nicht streng miteinander vergleichbar. Neben dem Spektrum von Glykosid E wurden daher auch von den Diglykosiden Scillaren A und Hellebrin (Bufadienolidglykoside) sowie dem Monoglykosid Sarmentosid A (Cardenolidglykosid) die protonengekoppelten ^{13}C-NMR-Spektren aufgenommen (in $DMSO_{d-6}$ gegen TMS).

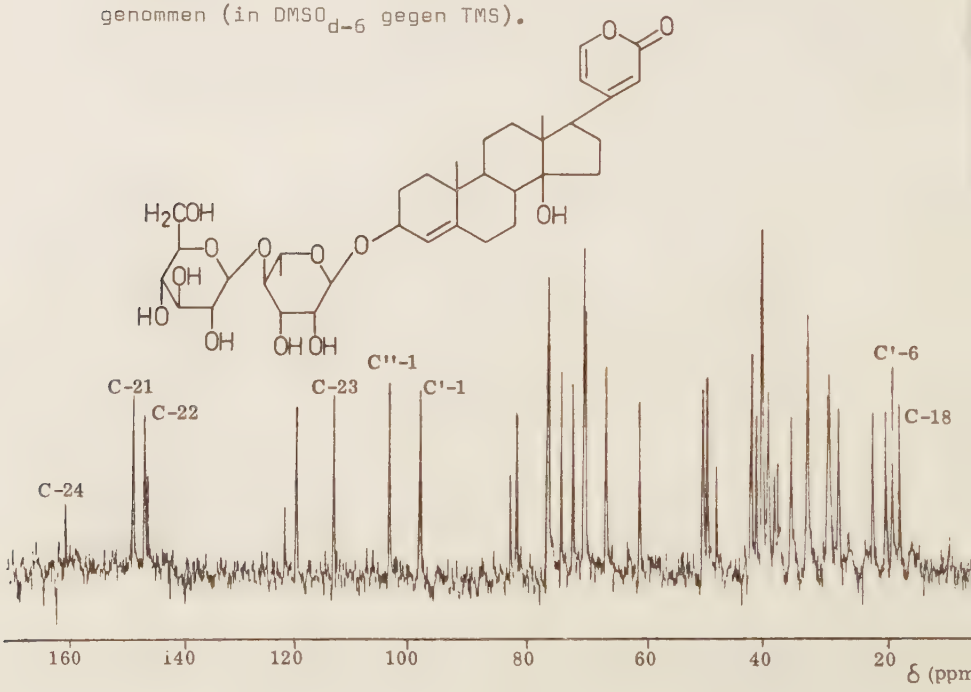


Abb. 28

20.15 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von Scillaren A (10 mg Glykosid in $DMSO_{d-6}$/TMS) protonenbreitbandentkoppelt

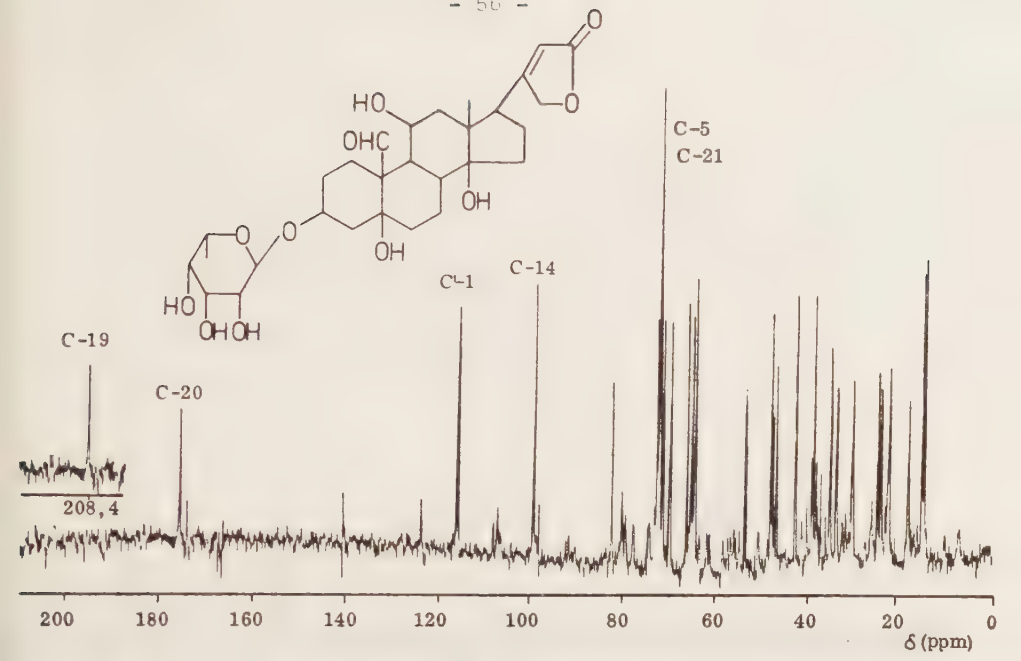


Abb. 29

20.15 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von Sarmentosid A (10 mg Glykosid in $DMSO_{d-6}$/TMS) protonenbreitbandentkoppelt

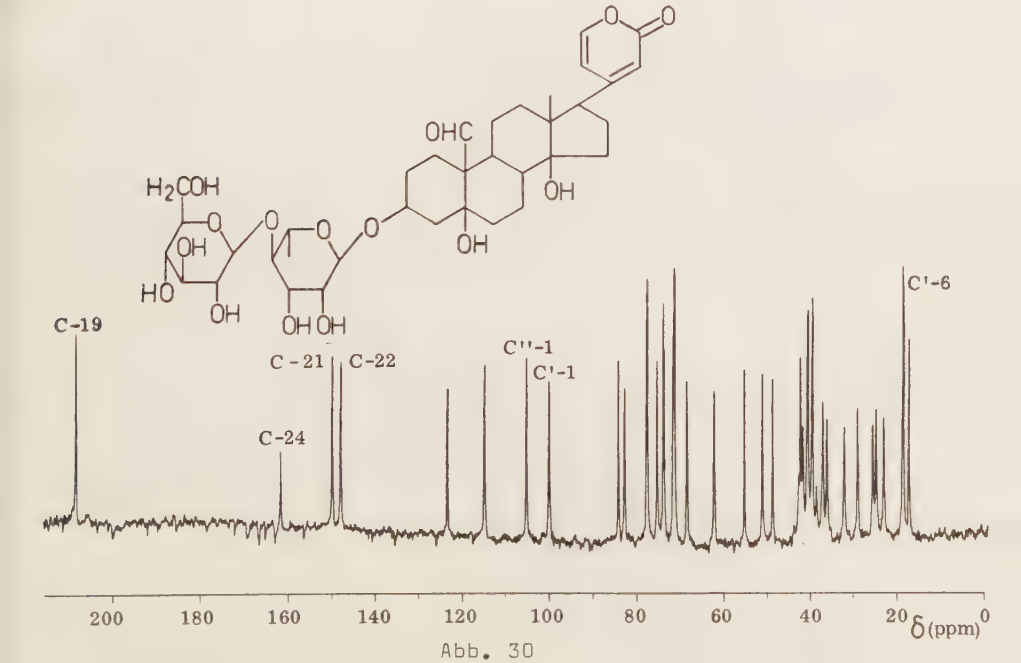


Abb. 30

20.25 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von Hellebrin (60 mg Glykosid in $DMSO_{d-6}$/TMS) protonenbreitbandentkoppelt

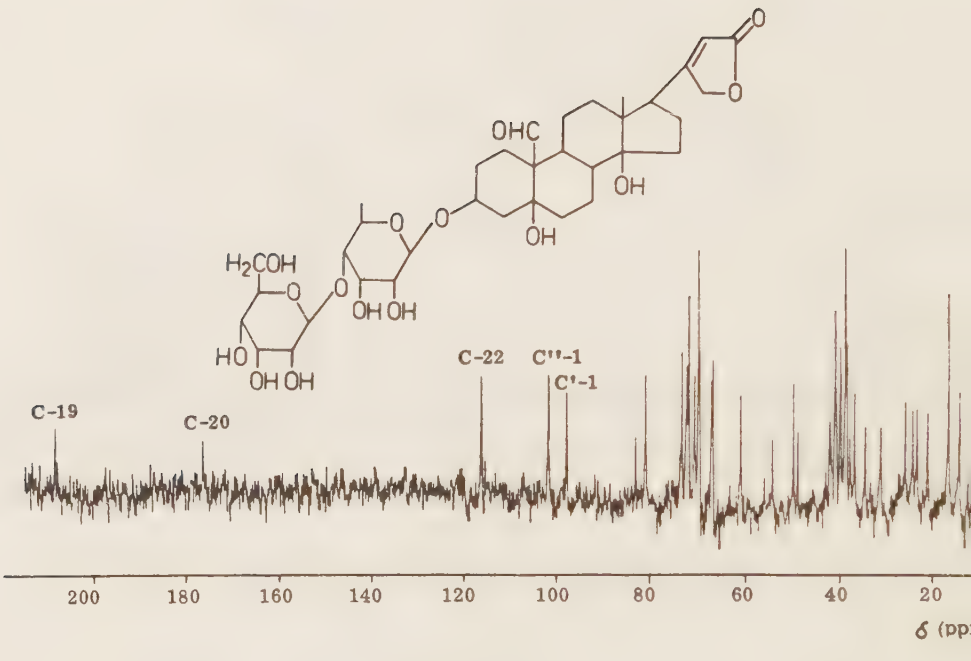
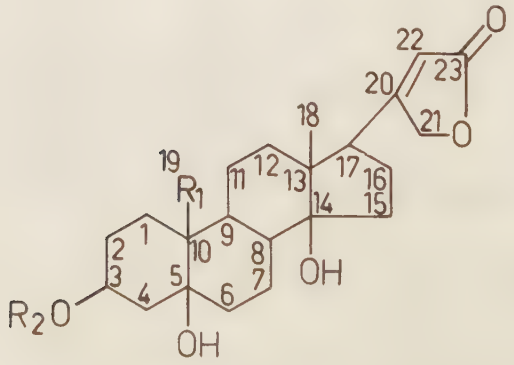


Abb. 31
20.15 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von Glykosid E (10 mg Glykosid in $DMSO_{d-6}$ TMS) protonenbreitbandentkoppelt

Tabelle 8, S. 58, gibt eine Gegenüberstellung der chemischen Verschiebungen von k-Strophanthidin und dem Aglykon von Glykosid E. Durch Vergleiche der Referenzspektren mit Literaturwerten [101,102,103,104] waren exakte Zuordnungen für die C-Atome möglich.



R_1 = -CHO
R_2 = Glykosyl-

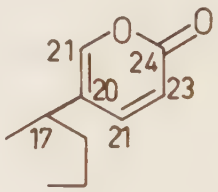
Tabelle 8: Vergleich der ^{13}C-NMR-Verschiebungen von k-Strophanthidin mit dem Aglykon von Glykosid E ($DMSO_{d-6}$ /TMS)

Zuordnung	k-Strophanthidin ppm	Glykosid E-Aglykon ppm
C-1	24.808	24.697
-2	28.342	26.272
-3 (glykosidiert)	73.34	72.919
-4	38.843	38.328
-5	73.138	72.495
-6	36.453	36.692
-7	24.034	23.849
-8	41.603	41.841
-9	39.92	39.721
-10	54.661	54.381
-11	22.284	21.607
-12	41.031	40.812
-13	48.031	48.99
-14	83.605	83.46
-15	35.477	34.39
-16	31.439	31.24
-17	49.293	49.899
-18	16.495	15.307
-19	208.166	208.136
-20	174.665	175.654
-21	71.98	72.495
-22	115.962	116.13
-23	173.241	—

Abweichend davon liegen bei Bufadienoliden mit ihrem zweifach ungesättigten δ -Lactonring die C-20 bis C-24-Werte wie in Tabelle 9, S. 59, angegeben.

Tabelle 9: ^{13}C-NMR-Werte des Bufadienolidrings ($DMSO_{d-6}$ / TMS)

Zuordnung	ppm
C-20	122.314
-21	149.47
-22	147.451
-23	114.232
-24	161.385



Damit ist die Strophanthidinstruktur von Glykosid E bestätigt. Weitere Signale zwischen δ = 61.348 und 101.635 ppm sowie bei δ = 17.488 waren den 12 Zucker-C-Atomen zuzuordnen. Zum Vergleich wurde das Spektrum von Methyl-β-D-allopyranosid in $DMSO_{d-6}$ aufgenommen und mit Literaturwerten [53,54,55] verglichen. Wie bekannt, zeigt C-2 der Methylzucker gegenüber den freien Zuckern eine Hochfeldverschiebung von ca. -0.7 ppm.

Tabelle 10: Vergleich der ^{13}C-NMR-Werte von Methyl-β-D-allopyranosid und β-D-Allopyranose

Zuordnung	Methyl-β-D-allopyranosid ppm ($DMSO_{d-6}$)	β-D-Allopyranose ppm (D_2O)
C"-1	101.574	94.28
-2	70.617	72.15
-3	71.344	72.02
-4	67.769	67.69
-5	74.373	74.41
-6	61.711	62.1
	($-OCH_3$ = 55.835)	

Den verbliebenen 12 Signalen wurde die Allose in folgender Weise zugeordnet:

Tabelle 11: Zuordnung der Allosesignale im ^{13}C-NMR-Spektrum von Glykosid E

Zuordnung	Signale von Glykosid E ppm
C"-1	101.635
	97.818
	81.44
-5	73.95
-3	71.283
-2	70.435
	70.435
	70.2
	67.6
-4	67.345
-6	61.348
	17.488

β-Talose schied als Hexosenkomponente aus, da ein Signal für C"-5 bei 76.4 ppm [62] im Spektrum des Glykosides nicht zu finden war, ebenso β-Galactose (C"-5 bei δ = 75.97 ppm).

Da Literaturvergleichswerte für 6-Desoxyallose oder Methyl-β-6-desoxyallosid fehlten, wurde versucht, diese theoretisch abzuleiten. GORIN [56] fand bei Vergleichen zwischen den ppm-Werten von Hexosen und zugehörigen 6-Desoxyhexosen bzw. deren Methylderivaten, daß neben C-6 nur C-4 und C-5 deutliche Verschiebungen aufweisen. Er gibt für Zucker mit äquatorialer C-4-Hydroxygruppe folgende Zusammenhänge an:

C-4: ppm Hexose + ca. 5 ppm ⟷ ppm 6-Desoxyhexose
C-5: ppm Hexose - ca. 3.9 bis 4.3 ppm ⟷ ppm 6-Desoxyhexose

Übertragen auf die Werte von Methyl-β-D-allopyranosid und die für Glykosid E gefundenen β-Allopyranosid-Werte ergäben sich für Methyl-β-6-desoxyallopyranosid folgende Zuordnungen:

Tabelle 12: Abgeleitete ^{13}C-NMR-Zuordnungen für Methyl-β-6-desoxy-D-allopyranosid ($DMSO_{d-6}$/TMS)

Zuordnung	Methyl-β-6-desoxy-D-allopyranosid ppm	
	(abgeleitet aus Methyl-β-D-allopyranosid)	(abgeleitet aus β-D-Allopyranosid in Glykosid E)
C'-2	70.61	70.43
-3	71.34	71.28
-4	72.77	72.34
-5	70.07	69.65

Theoretisch konnten in Glykosid E Allose und 6-Desoxyallose 1 ⟶ 2-, 1 ⟶ 3- oder 1 ⟶ 4-verknüpft sein. Aus den Vergleichsspektren ergab sich eine Tieffeldverschiebung von ca. +9 ppm für das C'-Atom des ersten Zuckers, dessen OH-Gruppe glykosiert war, gegenüber der freien Form. Einem Signal bei δ = 81.44 ppm von Glykosid E sollte demzufolge ein bei δ = 72.44 ppm erscheinendes Signal der freien 6-Desoxyallose entsprechen. Vergleichswerte für C'-4 von 72.77 bzw. 72.34 ppm bewiesen eindeutig die 1 ⟶ 4-Verknüpfung. Nach COLSON und KING [57] tritt im Falle einer 1 ⟶ 4-Glykosidierung eine Hochfeldverschiebung von -1.4 ppm für das C'-5-Atom ein. Dies ergibt für C'-5 Werte bei δ = 68.67 oder δ = 68.25 ppm (Tab.13). Die C'-1-Hochfeldverschiebung wird durch die direkte Bindung an das Steroidaglykon hervorgerufen.

Tabelle 13: Für 1 ⟶ 4-Verknüpfung abgeleitete ^{13}C-NMR-Werte des Desoxyzuckers im Vergleich mit Glykosid E-Signalen ($DMSO_{d-6}$/TMS)

Zuordnung	Methyl-β-6-desoxyallopyranosid ppm (abgeleitet aus Methyl-β-D-allopyranosid)	Methyl-β-6-desoxyallopyranosid ppm (abgeleitet aus β-D-Allopyranosid in Glykosid E)	6-Desoxyallosid in Glykosid E ppm
C'-1			97.818
-4	72.77	72.34	81.44 - 9 = 72.44
-3	71.34 ↓	71.28 ↓	70.435 +)
-2	70.61	70.63	70.2 +)
-5	68.67	68.25	67.6
-6			17.488

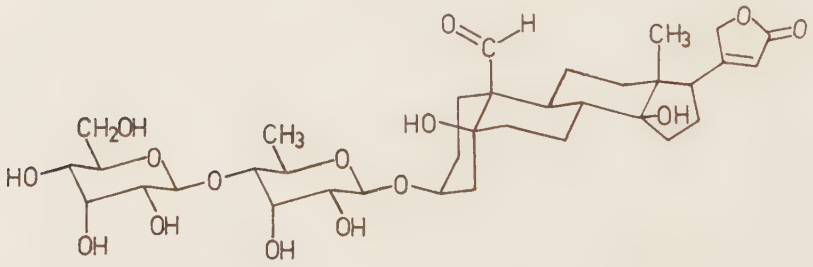
+) vertauschbar

↓ = im Falle einer 1 ⟶ 4-Verknüpfung wird eine geringe C'-3-Verschiebung nach höherem Feld beobachtet [57]

COLSON und KING [57] fanden auch einen Zusammenhang zwischen der chemischen Verschiebung des C"-2-Atoms der Hexose und der Verknüpfungsstelle am zweiten Zucker: 1 ⟶ 2- und 1 ⟶ 3-Bindungen verursachen eine deutliche Hochfeldverschiebung. Bei 1 ⟶ 4-Bindung ändert sich dagegen der ppm-Wert nicht. Letzteres trifft für C"-2 der Allose in E zu und spricht für eine 1 ⟶ 4-Verknüpfung.

Mit Hilfe eines protonengekoppelten ^{13}C-NMR-Spektrums von Glykosid E konnte die β-Verknüpfung der beiden Zucker bestätigt werden. Sowohl für C'-1 als auch für C"-1 ergaben sich Kopplungskonstanten ^{1}J = 160 Hz. Bei α-Konfiguration wären etwa 170 Hz zu erwarten gewesen [107].

Als einziges Diglykosid des Strophanthidins mit 6-Desoxyallose war bisher Glucostrophallosid [100] (= Strophanthidin-3-O-[4-O-β-D-glucopyranosyl-β-6-desoxy-D-allopyranosid]) aus Erysimum crepidifolium Rchb. bekannt. Das mit Glykosid E gefundene "Allostrophallosid" weist die bei Herzglykosiden bisher nicht gefundene Verbindung einer 6-Desoxyhexose mit D-Allopyranose auf. Glykosid E ist demnach Strophanthidin-3-β-O-[4-O-β-D-allopyranosyl-β-6-desoxy-D-allopyranosid].



$C_{35}H_{52}O_{15}$ MG 712.8 $[\alpha]_D^{21} = +7.63^{\circ}$

3.5. Glykosid F

Glykosid F vom Smp. = 201 - 205° war polarer als Glykosid E. Wieder waren das cardenolidtypische UV-Absorptionsmaximum bei 217 nm und die bekannten IR-Banden zu finden.

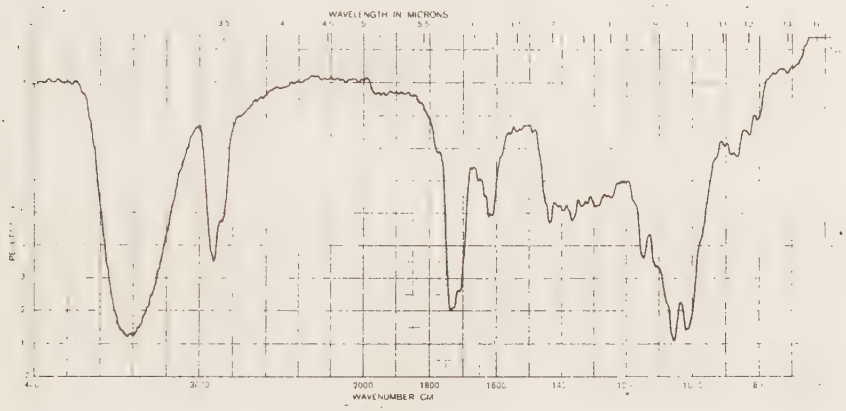


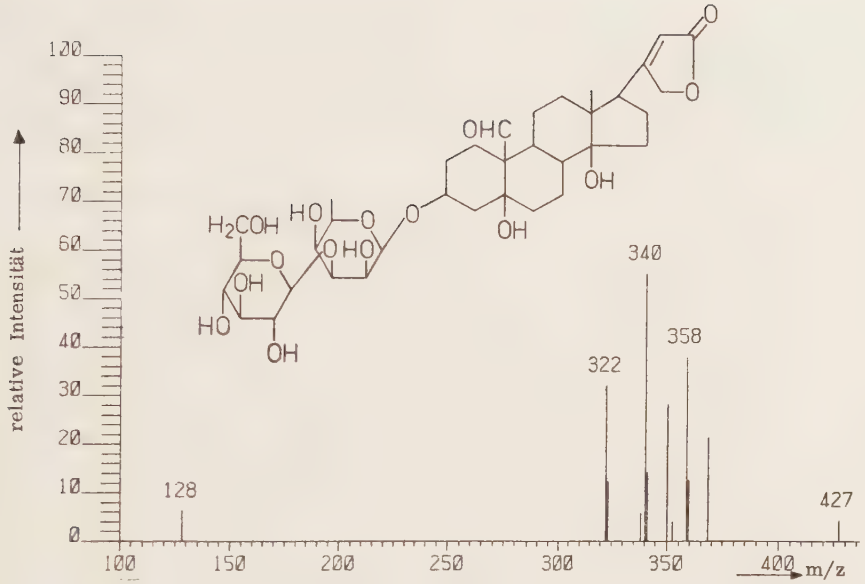
Abb. 32
IR-Spektrum von Glykosid F

Alle durchgeführten Farbreaktionen (85%ige H_2SO_4, Vanillin/Schwefelsäure, Chloramin/Trichloressigsäure, Antimon-(III)-chlorid/Chloroform, Xanthydrol) waren denen von Glykosid E gleich. Im Hydrolysat von F ließen sich k-Strophanthidin, Glucose und ein Monosid, das im DC nicht von Strophallosid zu unterscheiden war, nachweisen. Ein zweiter Zucker war mangels Vergleichssubstanz zunächst nicht zu identifizieren. Es sollte sich aber wieder um eine 6-Desoxyhexose handeln. Der R_f-Wert dieses Zuckers lag bei manchen Platten etwas höher als der von 6-Desoxyallose, bei anderen etwas niedriger. Der Peak befand sich im Zuckeranalysator unmittelbar neben 6-Desoxymannose und -gulose. Die Vermutung, es könnte ein Strophanthidin-glucohexamethylosid vorliegen, kam aus dem Fragmentierungsmuster im FD-MS. Das Spektrum war mit dem von Glykosid E prak-

tisch gleich. Neben den $[M + K]^+$- bzw. $[M + Na]^+$-Ionen bei m/z 751 und 735 konnten bei m/z 713 sogar der $[M + H]^+$-Peak, außerdem die Signale für die Abspaltung der Glucose (m/z 573) und 6-Desoxyhexose (427, 128) identifiziert werden.

Ionen	m/z
$[M + K]^+$	751
$[M + Na]^+$	735
$[M + H]^+$	713
$[(M + Na) - CO]^+$	707
$[(M + Na) - Z']^+$	573
$[(M + Na) - Z' - Z]^+$	427
$[M - Z' - Z - H_2O - CO]^+$	358
$[M - Z' - Z - 2\ H_2O - CO]^+$	340
$[M - Z' - Z - 3\ H_2O - CO]^+$	322
$[Z - H_2O]^+$	128

(Z = Desoxyhexose - H_2O
Z' = Hexose - H_2O)



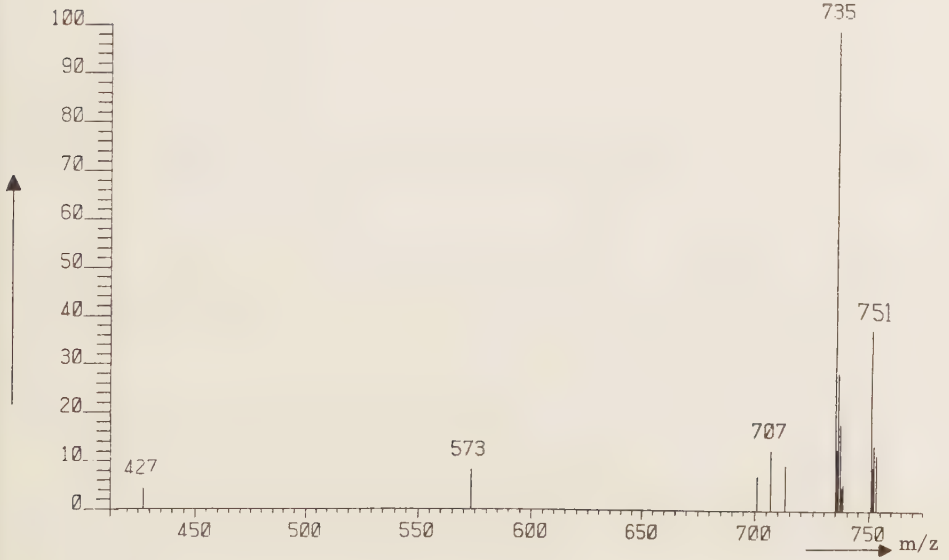


Abb. 33

FD-MS von Glykosid F bei 20 - 25 mA

Hydrolyseversuche mit Schneckenenzym und β-Glucosidase führten in beiden Fällen innerhalb von 24 Stdn. zu einem Monosid. Mit α-Glucosidase hingegen mißlang die Hydrolyse. Eine weitere Hydrolyse zum Aglykon fand erwartungsgemäß nicht statt. Damit war die endständige β-verknüpfte D-Glucose bewiesen.

Literaturangaben über 6-Desoxyhexosen deuteten auf 6-Desoxyidose, -altrose oder -talose als mögliche zweite Zuckerkomponente hin. Durch Hydrolyse von Sarmentosid A gewonnene 6-Desoxytalose war schließlich mit dem F-Zucker identisch. Aus den DC- und PC-Vergleichsserien von NOVER [58,59] wird deutlich, daß der DC-R_f-Wert bei Glykosiden mit α-glykosidischer Zuckerbindung höher als bei den entsprechenden β-Glykosiden liegt (bei PC umgekehrte Verhältnisse), gezeigt an den Beispielen Digitoxigenin-α,D /β,D -digitoxosid und Strophanthidin-α,D /β,D -rhamnosid.

Das bei der Hydrolyse von Glykosid F mit Trifluoressigsäure und Enzymen entstandene Monosid wies den gleichen R_f-Wert wie Strophallosid auf. Da 6-Desoxytalose etwas weniger polar als 6-Desoxyallose ist, wäre bei α-Verknüpfung wie in Sarmentosid A, Bipindosid und Sarmentolosid eine deutlich höhere Wanderungsgeschwindigkeit als in Strophallosid (β-verknüpfte 6-Desoxy-D-allose) für das Monosid zu erwarten gewesen. Daraus resultierte die Vermutung, die 6-Desoxytalose in Glykosid F könnte abweichend von der bisher bei Herzglykosiden gefundenen α-Verknüpfung eine β-Konfiguration aufweisen.

Die molekularen Drehungen für Methyltalopyranoside liegen bei $[M]_D = -51^\circ$ (β-D-) bzw. $+176^\circ$ (α-D-) [60]. Der Literatur zufolge unterscheiden sich die $[M]_D$-Werte der Methyl-6-desoxyhexosen nur wenig von denen der zugehörigen Methylhexosen. Die Richtung der Drehung bleibt ebenfalls erhalten.

Auf Grund der gelungenen Enzymhydrolysen (siehe oben) sollte in Glykosid F eine β-verknüpfte D-Glucose mit einem theoretischen Drehwert von $[M]_D = -66^\circ$ vorliegen.

Die Differenz von -112° aus $[M]_D$ Glykosid F = $+66^\circ$ ($[\alpha]_D^{25^\circ} = +9.35^\circ$)

und $[M]_D$ k-Strophanthidin = $+178^{\circ}$ ergibt den Drehwertbeitrag der beiden Zucker. Davon bleiben für das 6-Desoxytalopyranosid in Glykosid F nach Abzug des Glucosewertes $(-112^{\circ}) - (-66^{\circ}) = \underline{-46^{\circ}}$. Es mußte demnach eine β-verknüpfte 6-Desoxy-D-talopyranose vorliegen.

Die theoretischen $[M]_D$-Werte lauten:

Methylzucker [61]	D	L
Methyl-α-glucopyranosid	$+309^{\circ}$	-309°
Methyl-β-glucopyranosid	-66°	$+66^{\circ}$

^{13}C-NMR-Experimente sicherten die Identität und Konfiguration der Zucker und erlaubten die Festlegung der Verknüpfung von Glucose und 6-Desoxytalose. Daneben konnte k-Strophanthidin bestätigt werden.

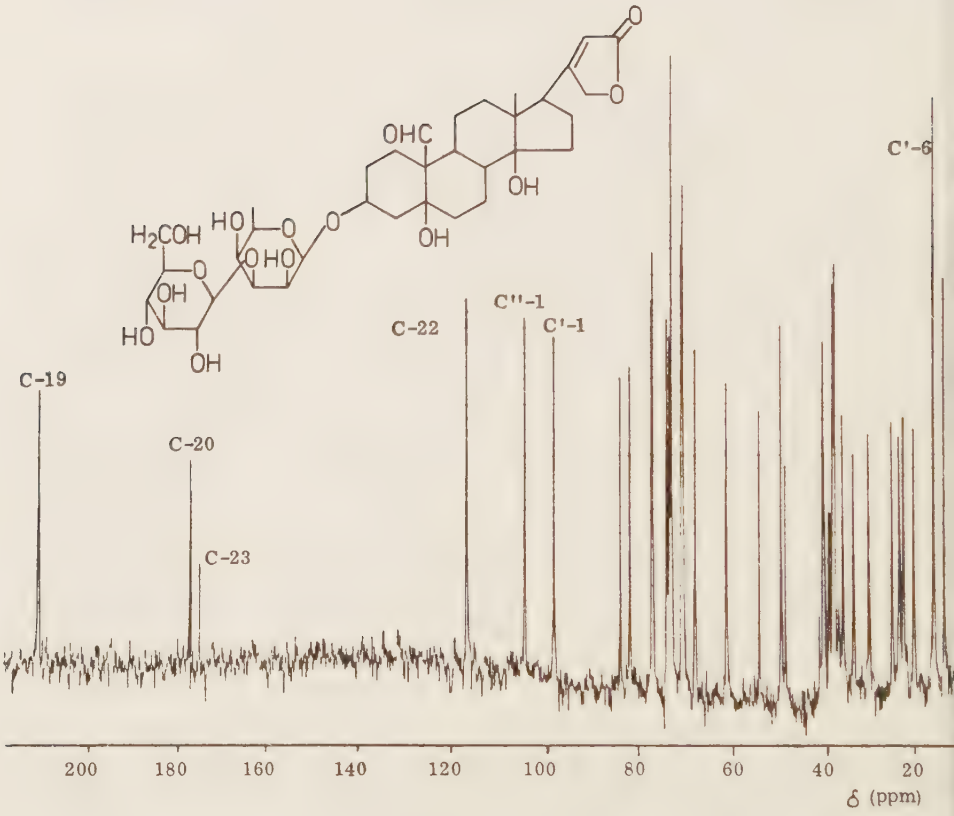


Abb. 34

20.15 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von Glykosid F (10 mg Glykosid in $DMSO_{d-6}$/TMS) protonenbreitbandentkoppelt

In Tabelle 14, S. 70, sind die chemischen Verschiebungen des Aglykons von Glykosid F mit k-Strophanthidin verglichen.

Tabelle 14: Vergleich der ^{13}C-NMR-Verschiebungen von k-Strophanthidin mit dem Aglykon von Glykosid F ($DMSO_{d-6}$/TMS)

Zuordnung	Glykosid F-Aglykon ppm	k-Strophanthidin ppm
C-1	24.758	24.808
-2	26.333	28.342
-3 (glyk.)	72.98	73.34
-4	38.328	38.843
-5	72.556	73.138
-6	36.692	36.453
-7	23.849	24.034
-8	41.71	41.603
-9	39.721	39.92
-10	54.442	54.661
-11	21.668	22.284
-12	40.933	41.031
-13	48.99	48.031
-14	83.521	83.605
-15	34.451	35.477
-16	31.24	31.439
-17	49.899	49.293
-18	15.307	16.495
-19	208.136	208.166
-20	175.664	174.665
-21	72.556	71.98
-22	116.174	115.962
-23	173.164	173.241

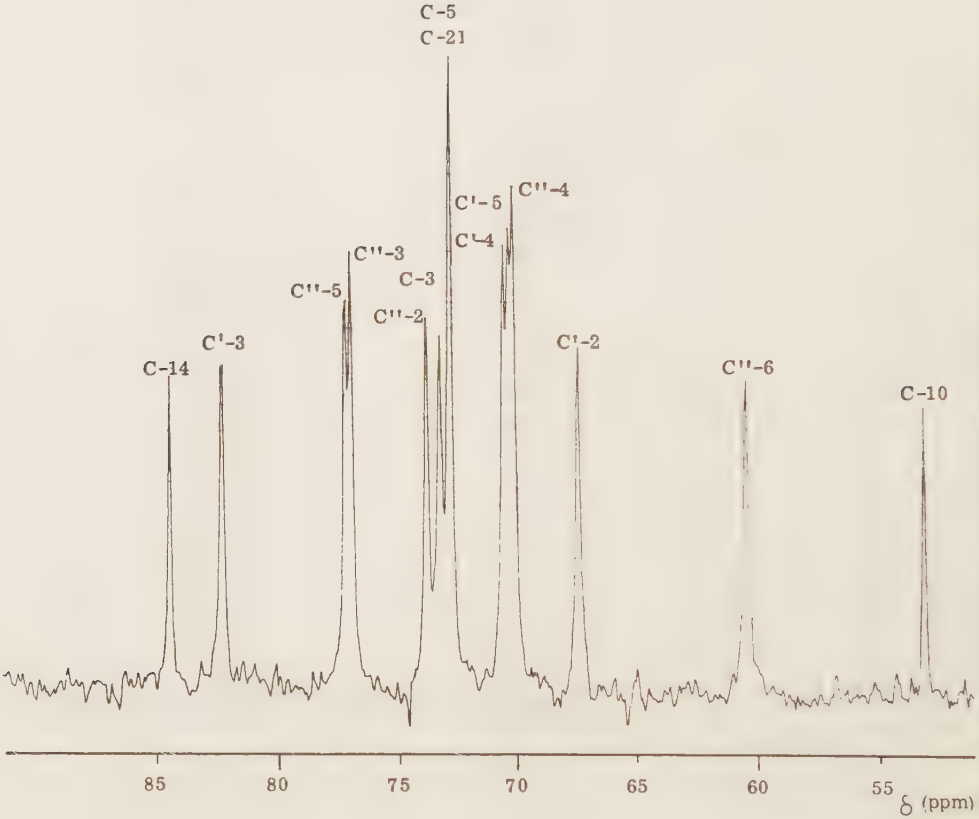


Abb. 35

20.15 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von Glykosid F (10 mg Glykosid in $DMSO_{d-6}$/TMS) protonenbreitbandentkoppelt, Zuckerbereich gespreizt

Von den restlichen 12 Signalen konnten der β-verknüpften Glucopyranose folgende Werte zugeordnet werden:

Tabelle 15: Zuordnung der Glucosensignale im ^{13}C-NMR-Spektrum von Glykosid F und Vergleich mit Hellebrin und Scillaren A (ppm,$DMSO_{d-6}$) [57]

Zuordnung	Werte der β-Glucopyranose in Hellebrin	Scillaren A	Werte von Glykosid F
C"-1	104.64	104.239	104.058
			97.818
			81.461
-5	77.043	76.614	76.675
-3	77.043	76.614	76.494
-2	74.75	74.433	73.523
			70.496
			70.314
-4	70.6	70.253	70.133
			67.649
-6	61.662	61.287	61.167
			17.427

Gegenüber den Glucosevergleichswerten von Hellebrin und Scillaren A war das C"-2-Atom von Glykosid F um etwa -0.9 ppm gegenüber dem von Scillaren A hochfeldverschoben, während die übrigen Glucosesignale bis auf 0.1 ppm genau gleich waren. COLSON und KING [57] fanden bei 1 ⟶ 2 und 1 ⟶ 3-verknüpften Hexosen gegenüber Rhamnose Hochfeldverschiebungen für das C"-2-Atom der Hexosen. Eine 1 ⟶ 4-Verknüpfung übt dagegen auf C"-2 keinen Einfluß aus, wie sich auch an Allose in Glykosid E sowie Glucose in Hellebrin und Scillaren A zeigte.

^{13}C-NMR-Vergleichswerte für 6-Desoxytalosen oder Methyl-6-desoxytaloside sind in der Literatur nicht bekannt. Es ist jedoch möglich, unter Beachtung bestimmter Regeln aus den Talosewerten die für Methyl-6-desoxytaloside zu errechnen. Erschwerend im

Falle der Talosen kam hinzu, daß die Literatur die Zuordnung der beiden Werte für C"-2 und C"-3 offenläßt, so daß zwei Wertegruppen (1a, 1b) diskutiert werden müssen.

Tabelle 16: ^{13}C-NMR-Werte für β-D-Talopyranose

Zuordnung	β-D-Talopyranose [62] ppm (D_2O / p-Dioxan)	
	1a	1b
C"-1	94.97	94.97
-2	72.5	69.6
-3	69.6	72.5
-4	69.36	69.36
-5	76.47	76.47
-6	62.17	62.17

GORIN [56] gibt für Zucker mit axialer C-4-Hydroxylgruppe beim Übergang von Hexosen zu 6-Desoxyhexosen folgende Zusammenhänge an:

C-4: ppm Hexose + ca. 2.5 ppm ⟷ ppm 6-Desoxyhexose
C-5: ppm Hexose - ca. 4 ppm ⟷ ppm 6-Desoxyhexose

Unter Einbeziehung der bekannten Hochfeldverschiebung von ca. -0.7 ppm für C"-2 auf Grund Methylierung an C"-1 ergeben sich für die C'-2-bis C'-5-Atome von Methyl-β-6-desoxytalopyranosid folgende Werte:

Tabelle 17: Aus Tabelle 16 abgeleitete ^{13}C-NMR-Werte für Methyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid

Zuordnung	Methyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid ppm	
	2a	2b
C'-2	71.8	68.9
-3	69.6	72.5
-4	71.8	71.8
-5	72.4	72.4
-6	ca. 17	ca. 17

Wenn man die durch die Glykosidierung bedingte Verschiebung der 6-Desoxyhexose in Glykosid F (Hexose-6-Desoxyhexose) abzieht, kommt man zu einem Wert von ca. δ = 72.4 ppm (ppm 81.461 - 9 = 72.4). Theoretisch möglich wäre eine 1 ⟶ 2-, 1 ⟶ 3- oder 1 ⟶ 4-Verknüpfung. Die letzte war bereits durch die Glucosenverschiebung an C"-2 auszuschließen. Da im übrigen die in D_2O gemessenen Werte eher etwas höher liegen als in $DMSO_{d-6}$, ist eine 1 ⟶ 4-Verknüpfung entsprechend einem C'-4-Wert von δ = 71.8 ppm oder etwas weniger nicht denkbar. Eine 1 ⟶ 2-Verknüpfung ist theoretisch nur bei den Werten von 2a möglich, wobei das C'-2-Signal bei δ = 71.8 ppm oder weniger nicht mit dem Glykosid F-Wert von ca. 72.4 ppm korrelierbar ist. Kalkuliert man noch nach GORIN die Tieffeldverschiebungen von +0.4 für C'-3 und +0.3 für C'-5 unter der Voraussetzung einer 1 ⟶ 2-gebundenen β-Hexose ein, so scheidet auch eine 1 ⟶ 2-Verknüpfung für Glykosid F aus. Eine 1 ⟶ 3-Anordnung ist nur bei 2b möglich (C'-3 = 72.5 ppm). Abzüglich einer Hochfeldverschiebung von -0.9 ppm für C'-4 kommt man zur Zuordnung von Tabelle 18, wenn man die 2b-Werte aus Tabelle 17 auf die 1 ⟶ 3-Bindung hin korrigiert: +)

Tabelle 18: Vergleich der korrigierten ^{13}C-NMR-Werte von Methyl-β-6-Desoxy-D-talopyranosid mit Glykosid F

Zuordnung	Methyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid, korr. ppm	Glykosid F ppm
C'-1		97.818
-3	72.5	81.461-9 = 72.4
-5	72.4 ↓	70.496
-4	70.9	70.314
-2	68.9 ↓	67.649
-6		17.427

+) Diese Zuordnung 2b stimmt auch mit VOELTER [143] überein.

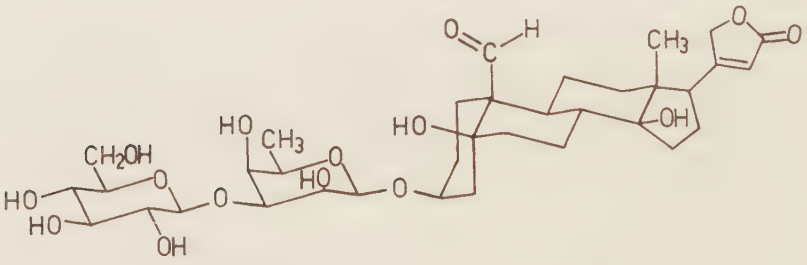
Hochfeldverschiebungen für C'-2 und C'-5 wurden auch von COLSON und KING [57] bei1⟶ 3-Verknüpfungen beobachtet (↓). Die C'-1-Werte in den Glykosiden E und F waren außerdem identisch, was mit den fast identischen C-1-Werten von β-Allopyranose und β-Talopyranose in Einklang steht.

Zum endgültigen Beweis der β-verknüpften Glucose und 6-Desoxytalose nahmen wir von Glykosid F ein protonengekoppeltes ^{13}C-NMR-Spektrum auf.

Die Kopplungskonstanten der beiden anomeren Zucker-C-Atome lagen bei ^{1}J = 156 Hz (β-Glucose) und 155 Hz (β-Desoxytalose), womit die Konfiguration gesichert war.

Da sich aus der Molekulardrehung ergibt, daß in beiden Fällen D-Zucker vorliegen, muß das neue Glykosid F als Strophanthidin-3-β-O-[3-O-β-D-glucopyranosyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid] bezeichnet werden.

Ein Monosid des k-Strophanthidins mit β-6-Desoxy-D-talopyranose ist ebenfalls bisher nicht bekannt.



$C_{35}H_{52}O_{15}$ MG 712.8 $[\alpha]_D^{25^\circ} = +9.35^\circ$

3.6. Glykosid G 1

Glykosid G 1 vom Smp. 231 - 235°, der optischen Drehung von $[\alpha]_D^{25°} = +8.69°$, dem UV-Maximum bei 217 nm und den üblichen IR-Banden wies nur geringfügige Unterschiede zu den anderen isolierten Glykosiden auf.

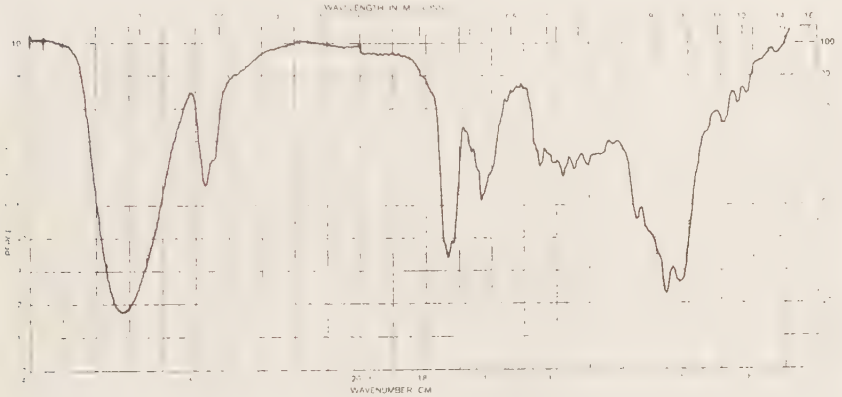


Abb. 36
IR-Spektrum von Glykosid G 1

Die verschiedenen Reagenzien färbten Glykosid G 1 genauso an wie Antiallosid. Dünnschichtchromatographisch war im Hydrolysat u.a. Antiarigenin nachweisbar. Das vermutliche Monosid von Glykosid G 1 war chromatographisch nicht von Antiallosid zu unterscheiden.

Glykosid G 1 gab die bereits erwähnte, für 12-Hydroxysteroide charakteristische Reaktion nach JENSEN und KAISER [48]. Auf der DC-Platte und am Zuckeranalysator konnten 6-Desoxytalose und Gulose als Zucker identifiziert werden. Glykosid G 1 war weder durch Schneckenenzym noch durch reine α- oder β-Glucosidase spaltbar.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen erschienen im FD-MS die Signale $[M + Na]^+$ 751 m/z; $[(M + Na) - CO]^+$ 723 m/z; $[(M + Na) - Z']^+$ 589 m/z; $[(M + Na) - Z' - Z]^+$ 443 m/z; $[M + 2\ Na]^{2+}$ 387 m/z. (Z = 6-Desoxyhexose - H_2O; Z' = Hexose-H_2O).

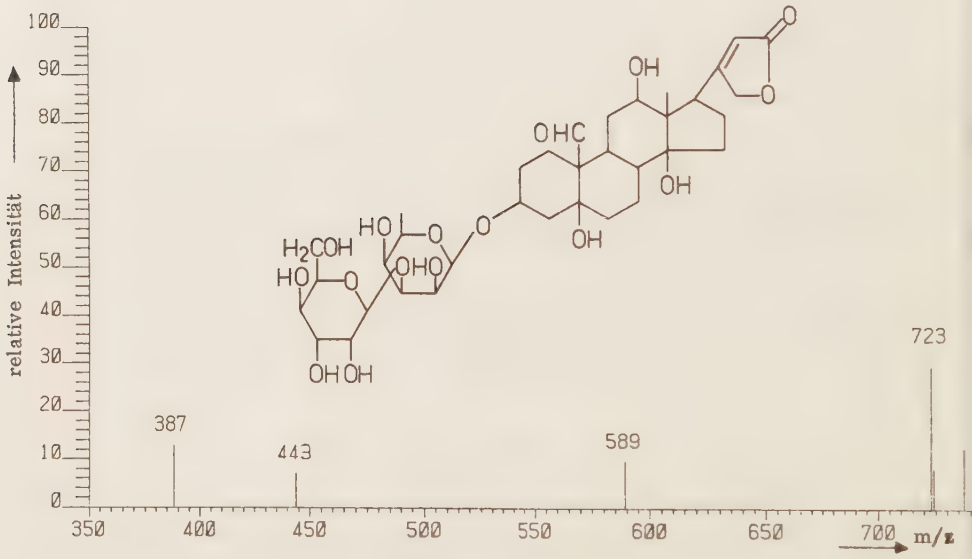


Abb. 37
FD-MS von Glykosid G 1 bei 25 - 30 mA

Es lag ein Diglykosid vor, in dem die 6-Desoxytalose direkt an das Aglykon gebunden sein mußte.

Nach der KLYNE-Regel mußten die Zucker β-D-Konfiguration haben

Aus dem für Glykosid F gefundenen $[M]_D$-Wert von -46° für ein β-6-Desoxy-D-talopyranosid und dem Literaturwert von -162° für Methyl-β-D-gulopyranosid errechnet sich ein theoretischer Wert

von $[M]_D = -208^o$ für die G 1-Zucker und damit eine Abweichung von 98^o gegenüber der Differenz von -110^o aus den $[M]_D$-Werten von Glykosid G 1 = $+63^o$ und Antiarigenin = $+173^o$ [131].

Die theoretischen $[M]_D$-Werte sind [61]:

Methylzucker	D	L
Methyl-α-gulopyranosid	$+232^o$	-232^o
Methyl-β-gulopyranosid	-162^o	$+162^o$

Durch das ^{13}C-NMR-Spektrum konnte die 12-OH-Gruppe des Antiarigenins bestätigt werden. Der Ersatz des H-Atoms am C-12 des k-Strophanthidins durch eine OH-Gruppe bewirkt bei den C-Atomen C-8, -11, -12, -13, -14, -17 und -18 eine z.T. starke Verschiebung.

LUKACS [101] vergleicht ^{13}C-NMR-Werte von Digoxigenin (12-β-OH) und k-Strophanthidin und findet folgende Verschiebungen:

Tabelle 19: Unterschiedliche ^{13}C-NMR-Werte von Digoxigenin und k-Strophanthidin nach LUKACS ($CDCl_3$/TMS)

Zuordnung	Digoxigenin ppm	k-Strophanthidin ppm
C-8	41.3	40.2 oder 42.2
-11	30.0	18.1 oder 22.8
-12	74.8	40.2
-13	56.4	50.1
-14	85.8	85.3
-17	46.1	51.4
-18	9.4	16.2

Für die Signale von Glykosid G 1 ergibt sich im Vergleich zu denen von Glykosid F-Aglykon folgende Zuordnung:

Tabelle 20: Vergleich der ^{13}C-NMR-Werte von Glykosid G 1-Aglykon mit Glykosid F-Aglykon (in $DMSO_{d-6}$/TMS)

Zuordnung	Glykosid G 1 (Aglykon) ppm	k-Strophanthidin (Glykosid F) ppm
C-1	24.697	24.758
-2	26.757	26.333
-3 (glyk.)	73.283	72.98
-4	38.752	38.328
-5	72.798	72.556
-6	36.692	36.692
-7	24.031	23.849
-8	41.72	41.71
-9	39.782	39.721
-10	54.2	54.442
-11	30.452	21.668
-12	72.798	40.933
-13	55.351	48.99
-14	84.066	83.521
-15	34.451	34.451
-16	31.603	31.24
-17	45.113	49.899
-18	9.128	15.307
-19	208.32	208.136
-20	176.33	175.664
-21	72.798	72.556
-22	115.93	116.174
-23	173.79	173.164

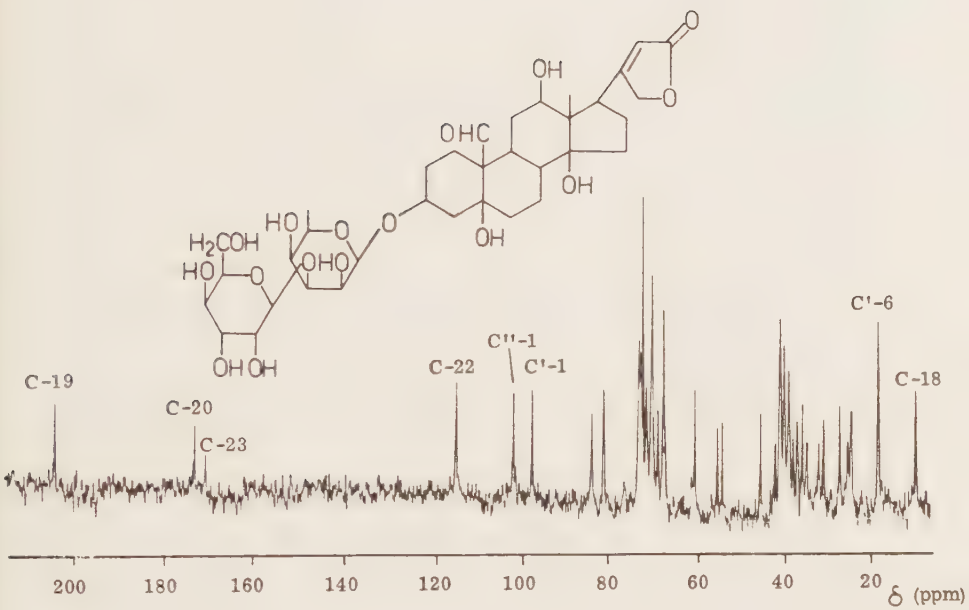


Abb. 38

20.15 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von Glykosid G 1 (10 mg Glykosid in $DMSO_{d-6}$/TMS) protonenbreitbandentkoppelt

In Glykosid G 1 ist damit das Aglykon Antiarigenin eindeutig charakterisiert. Zugleich ist die 12-β-Hydroxygruppe bewiesen, da eine α-Stellung eine deutliche Hochfeldverschiebung zur Folge gehabt hätte. Z.B. unterscheiden sich die C-OH-Werte für cis- und trans-3-Methylcyclohexanol bzw. trans- und cis-4-Methylcyclohexanol um etwa -4 ppm. TAMM [131] konnte früher die β-Konfiguration der 12-OH-Gruppe des Antiarigenins nicht eindeutig beweisen.

Die β-Verknüpfung der 6-Desoxytalose in Glykosid G 1 konnte durch die nahezu identischen ^{13}C-NMR-Werte dieses Zuckers in Glykosid F festgelegt werden (Tab. 21, S. 82). Die α-verknüpfte 6-Desoxytalose in Sarmentosid A wies andere Werte auf als sie bei Glykosid G 1 und F erschienen. Das anomere C-1-Atom z.B. hatte ein Signal bei δ = 99.6 ppm gegenüber δ = 97.88 ppm im Glykosid G 1 und δ = 97.818 ppm in Glykosid F. Aus den nahezu identischen Werten resultierte auch für Glykosid G 1 die bei Glykosid F beobachtete 1 ⟶ 3-Verknüpfung.

Die restlichen Peaks im Spektrum von Glykosid G 1 waren Signale der β-D-Gulose. Da es in der Literatur weder für Gulosen noch für Methylguloside ^{13}C-NMR-Vergleichswerte gibt, wurden diese für β-D-Gulopyranosid in folgender Weise zugeordnet:
C"-1- und C"-6-Signale müssen bei δ = 102.241 bzw. 60.82 ppm liegen. C"-2 von β-Gulosid und β-Allosid dürfte die gleiche Verschiebung aufweisen, da bei beiden die OH-Gruppe an C"-2 äquatoriale und die benachbarte an C"-3 axiale Lage hat. Einschließlich einer Hochfeldverschiebung von etwa -1.2 ppm (1 ⟶ 3-Verknüpfung, siehe unter Glykosid F) ergibt sich ein theoretischer C"-2-β-Gulopyranosid-Wert von ppm 70.4 - 1.2 = 69.2. Dem C"-5-Atom sollte das Signal bei 73.586 ppm zukommen. Den C"-3- und C"-4-Atomen entsprechen in Analogie zu Vergleichszuckern mit ähnlicher Konformation die Werte δ = 71.83 und 67.891 ppm.

Tabelle 21: Zuordnung der ^{13}C-NMR-Signale von β-D-Gulose (C") und β-6-Desoxy-D-talose (C') im Spektrum von Glykosid G 1 und Vergleich mit den β-6-Desoxy-D-talopyranosidwerten von Glykosid F ($DMSO_{d-6}$/TMS)

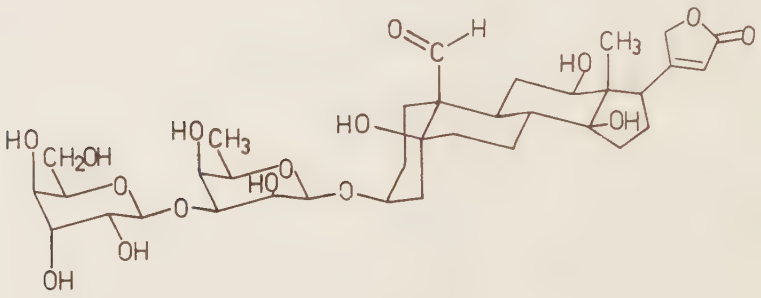
Zuordnung	Zuckersignale von Glykosid G 1 ppm	β-6-Desoxy-D-talopyranosid-Signale von Glykosid F ppm
C"-1	102.241	
C'-1	97.88	97.818
C'-3	81.4	81.461
C"-5	73.586	
C"-3	71.83	
C'-5 +)	70.617	70.496
C'-4 +)	70.617	70.314
C"-2	69.103	
C"-4	67.891	
C'-2	67.891	67.649
C"-6	60.82	
C'-6	17.67	17.427

+) = vertauschbar

Tabelle 22: Abgeleitete ^{13}C-NMR-Werte für β-D-Gulopyranosid in $DMSO_{d-6}$/TMS

Zuordnung	β-D-Gulopyranosid ppm
C-1	102.241
-5	73.586
-3	71.83
-2	70.4
-4	67.891
-6	60.82

Damit ist Glykosid G 1 als neues Antiarigenin-3-β-O-[3-O-β-D-gulopyranosyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid] bewiesen.



$C_{35}H_{52}O_{16}$ MG 728.8 $[\alpha]_D^{25^\circ} = +8.69^\circ$

3.7. Glykosid G 2

Glykosid G 2 vom Smp. = 215 - 218° verhielt sich im UV- und IR-Spektrum wie Glykosid G 1.

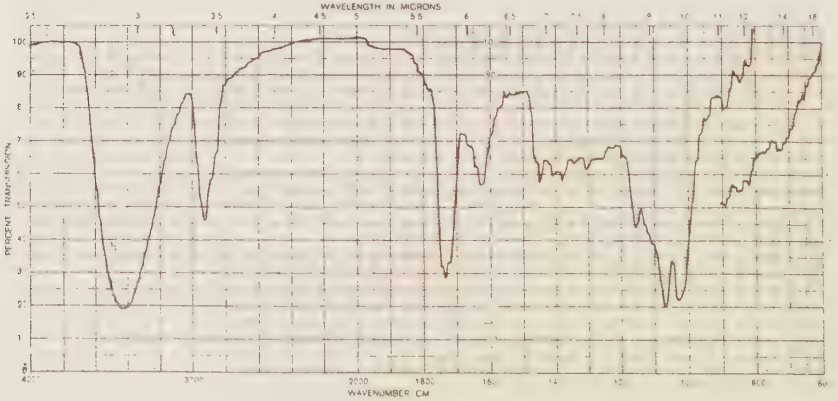


Abb. 39

IR-Spektrum von Glykosid G 2

Die optische Drehung $[\alpha]_D^{25}$ betrug +5.62°. Identisch waren die Farbreaktionen, insbesondere die mit Xanthydrol (Zucker) und der Fluoreszenztest nach JENSEN und KAISER (C-12-Hydroxysteroide). Die Spaltprodukte des Säurehydrolysats zeigten auf der DC-Platte Übereinstimmung mit Antiallosid bzw. Antiarigenin. Eine Enzymhydrolyse gelang nicht. Als Zucker konnten durch FD-MS, DC, ZA und ^{13}C-NMR-Spektrum 6-Desoxyallose und mit den gleichen Methoden Allose identifiziert werden. Die ZA-Analyse gestattete lediglich die Feststellung Allose, Galactose oder Talose (siehe Allg.Teil 4.2., S. 96).

Das FD-MS lieferte die charakteristischen $[M + K]^+$- und $[M + Na]^+$-Peaks bei m/z = 767 und 751. Außerdem waren die für die Abspaltung der endständigen Hexose und des 6-Desoxyzuckers charakteristischen Werte bei m/z = 589 und 443 vorhanden. Folgende Zuordnung konnte getroffen werden:

Tabelle 23: Zuordnung im FD-MS von Glykosid G 2

Ionen	m/z
$[M + K]^+$	767
$[M + Na]^+$	751
$[(M + Na) - CO]^+$	723
$[(M + Na) - Z']^+$	589
$[(M + Na) - Z' - Z]^+$	443
$[M + 2\ Na]^{2+}$	387

(Z = 6-Desoxyallose- H_2O
Z' = Allose - H_2O)

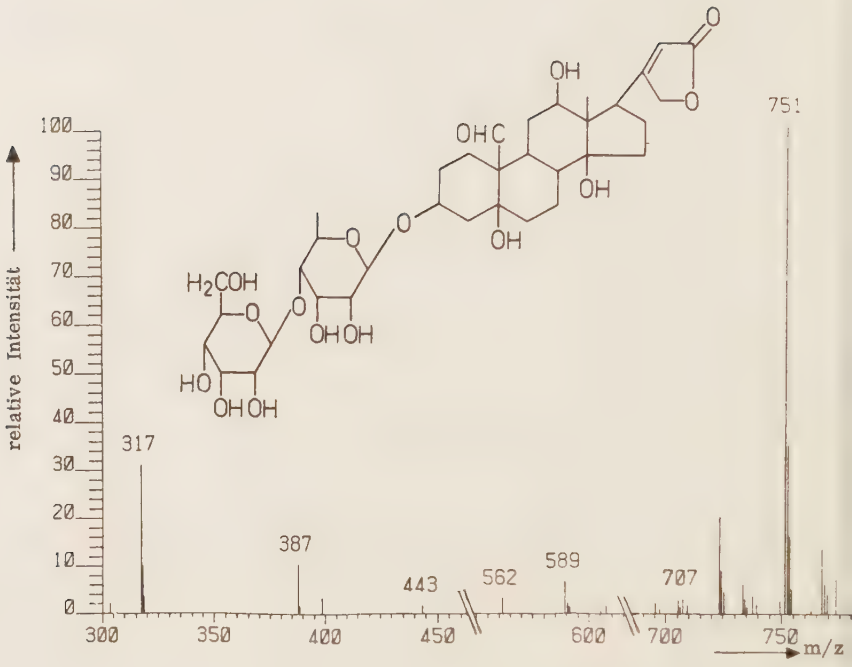


Abb. 40
FD-MS von Glykosid G 2 bei 25 - 30 mA

Der Vergleich der Molekulardrehung von Glykosid G 2 mit den Werten für die Einzelkomponenten ergab wie bei Glykosid E bei beiden Zuckern β-D-Anordnung. Die Differenz aus den molekularen Drehungen von Glykosid G 2 = $+51^{\circ}$ und Antiarigenin = +173 war -122° für die beiden Zucker. In Glykosid E hatten wir bei gleichen Zuckern -128° gefunden (Vergleichswerte siehe Allg. Teil 3.4., S. 54 und 3.6., S. 78).

Die Zuordnung der Aglykonsignale im ^{13}C-NMR-Spektrum von G 2 ergab keine nennenswerten Abweichungen zu den G 2-Werten. Die die C-12-β-Hydroxylgruppe beweisenden Signale sind unterstrichen.

Tabelle 24: ^{13}C-NMR-Signale von Glykosid G 2- und Glykosid G 1-Aglykon ($DMSO_{d-6}$/TMS)

Zuordnung	G 2-Aglykon ppm	G 1-Aglykon ppm
C-1	24.7	24.697
-2	26.64	26.757
-3 (glyk.)	73.16	73.283
-4	38.631	38.752
-5	72.73	72.798
-6	36.632	36.692
-7	23.9	24.031
-8	41.72	41.72
-9	39.661	39.782
-10	54.2	54.2
-11	30.45	30.452
-12	72.73	72.798
-13	55.35	55.351
-14	83.945	84.066
-15	34.451	34.451
-16	32.27	31.603
-17	45.11	45.113
-18	9.07	9.128
-19	208.196	208.32
-20	176.27	176.33
-21	72.73	72.798
-22	115.811	115.93
-23	-	173.79

Die C-Werte der Allose konnten analog Glykosid E festgelegt werden.

Tabelle 25: ^{13}C-NMR-Werte der Zucker in Glykosid G 2 im Vergleich mit Methyl-β-D-allopyranosid ($DMSO_{d-6}$/TMS)

Zuordnung	Glykosid G 2 ppm	Methyl-β-D-allopyranosid ppm
C"-1	101.7	101.574
	97.87	
	81.52	
-5	74.07	74.373
-3	71.40	71.344
-2	70.56	70.617
	70.56	
	70.56	
-4	67.52	67.769
	67.52	
-6	61.47	61.711
	17.55	

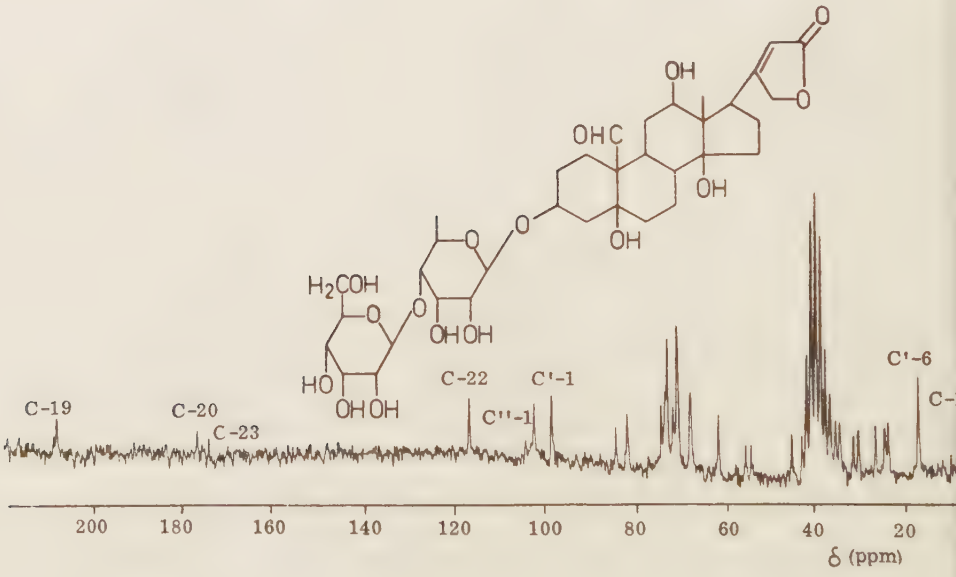


Abb. 41

20.15 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von Glykosid G 2 (10 mg Glykosid in $DMSO_{d-6}$/TMS) protonenbreitbandentkoppelt

Die im Zuckeranalysator nicht mögliche Unterscheidung zwischen Allose, Galactose und Talose gelang wie bei Glykosid E durch das ^{13}C-NMR-Spektrum und durch DC-Vergleich. Im ^{13}C-NMR-Spektrum fehlten die für C-5 von β-Galactose und β-Talose charakteristischen Signale bei δ = 75.97 ppm und δ = 76.47 ppm [62]. Von den übrigen Signalen waren C'-1 (97.87 ppm) und C'-6 (17.55 ppm) mit den entsprechenden Werten von Glykosid E identisch. Das Signal bei 81.52 ppm abzüglich der durch die Glykosidierung bedingten Verschiebung von -9 ppm mußte mit etwa 72.5 ppm im Vergleichsspektrum zu finden sein. Unter Zugrundelegung der abgeleiteten Methyl-β-6-desoxyallopyranosid-Werte (A in Tab. 26, siehe auch Tab. 13, S. 62) ergibt sich eine eindeutige 1 ⟶ 4-Verknüpfung der beiden Zucker im Glykosid G 2. Zum Vergleich B wurde die Desoxyhexose aus den Allosewerten von G 2 abgeleitet.

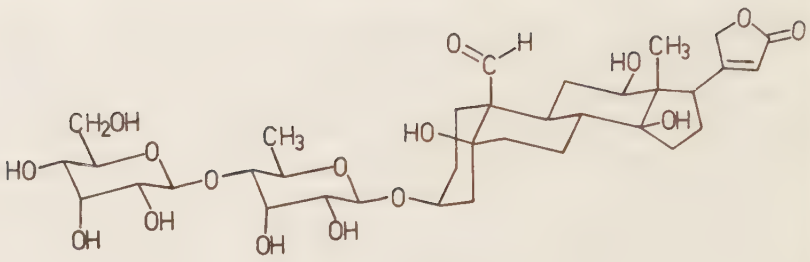
Tabelle 26: Zuordnung der 6-Desoxyallose im ^{13}C-NMR-Spektrum von Glykosid G 2

Zuordnung	Methyl-β-6-desoxyallopyranosid ppm A	(korrigiert) B	6-Desoxyallosid in Glykosid G 2 ppm
C'-1			97.87
-4	72.77	72.52	81.52-9 = 72.52
-3	71.34 ↓	71.4 ↓	70.56 +)
-2	70.61	70.56	70.56 +)
-5	68.67	68.37	67.52
-6			17.55

+) = vertauschbar

↓ = bereits früher festgestellte geringe Verschiebung von C'-3 nach höherem Feld bei 1 ⟶ 4-Verknüpfung

Glykosid G 2 ist somit Antiarigenin-3-β-O-[4-O-β-D-allopyranosyl-β-6-desoxy-D-allopyranosid].



$C_{35}H_{52}O_{16}$ MG 728.8 $[\alpha]_D^{25^\circ} = +5.62^\circ$

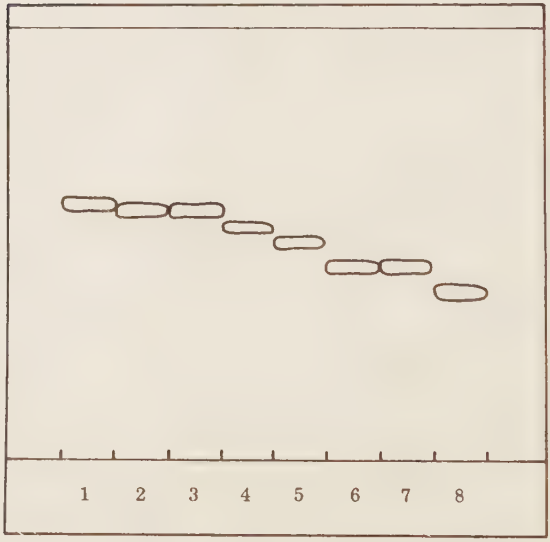


Abb. 42

DC-Übersicht: Monoglykoside des k-Strophanthidins und Antiarigenins

1 = Descheirotoxin
2 = Hydrolysat von F (Strophanthidingluco-talomethylosid)
3 = Strophallosid
4 = Convallatoxin
5 = Strophanthidinchinovosid
6 = Hydrolysat von G 1 (Antiarige-ningulotalomethylosid)
7 = Antiallosid
8 = β-Antiarin

Laufmittelsystem: Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) (Kieselgel)

Detektion: KEDDE

3.8. Weitere identifizierte Cardenolide

Lophopetalum toxicum enthält neben den isolierten und aufgeklärten Glykosiden noch mindestens 8 weitere KEDDE-positive Substanzen, darunter die sehr polaren Glykoside H 1 und H 2. Stark angereichert wurden im Verlauf der Fraktionierung die Substanzen A, C und D 4, so daß Farb- und Fluoreszenzreaktionen durchgeführt werden konnten.

Die Verbindung A erwies sich mit k-Strophanthidin, C mit Antiarigenin als identisch. Die Substanz D 4 konnte als β-Antiarin (= Antiarigenin-3-O-α-L-rhamnosid) [63] identifiziert werden.

4. Analytische Verfahren

4.1. FD- und D/IC-MS-Spektroskopie

Die Einsatzmöglichkeit der erst seit einigen Jahren bei der Strukturaufklärung von Herzglykosiden verwendeten Felddesorptions-Massenspektroskopie [64] wurde an den beiden "polaren" Glykosiden Convallatoxin und k-Strophanthosid genauer studiert [65]. Convallatoxin gab im FD-MS nur ein schwaches Signal für das $[M + H]^+$-Ion. Auch das Signal bei m/z 405, das von dem Aglykon k-Strophanthidin stammt, wurde nur mit 8% relativer Intensität erhalten, während das Zuckerfragment bei m/z 147 den Basispeak ergab. Eine deutliche Erhöhung des Molekülpeaks ließ sich nach Zusatz von Alkalisalz beobachten [66,67,68,69]. Nach Zugabe von 0.1 - 1% Natriumchlorid zur Convallatoxin-Probe war jetzt das $[M + Na]^+$-Ion Basissignal. Zusätzlich zu dem $[M + Na]^+$-Ion erschien bei m/z 589 ein $[M + K]^+$-Ion, das auf die im NaCl vorhandene Verunreinigung zurückzuführen war. Auch beim FD-MS von k-Strophanthosid ermöglicht erst Alkalizugabe die Auswertung. Das Auftraten des $[M + 2Na]^{2+}$-Ions stellte einen zusätzlichen Beweis für das Molekulargewicht dar. Derartige "Kationisierungen" können nicht nur am Glykosid, sondern auch an Glykosidfragmenten, z.B. am Aglykon oder dessen Abbauprodukten, stattfinden. Alkalifreie Substanzen müssen demzufolge mit Kationen versetzt werden, um den Molekülpeak mit Sicherheit erfassen zu können. Die optimale Salzkonzentration von 0.1 - 1% kann leicht flammenphotometrisch überprüft bzw. eingestellt werden. Ein zu hoher Salzanteil in der Probe verhindert die Messung. Die Entsalzung kann mit Hilfe von Ionenaustauschchromatographie (SEPHADEX) erfolgen.

Die polaren Lophopetalum-Glykoside enthielten in der Regel von Anfang an Alkalisalze, mit Ausnahme des am wenigsten polaren Strophallosids (Glykosid D 1). Bei allen anderen waren zusätzlich zum $[M + H]^+$-Peak die entsprechenden Signale für die Na^+/K^+-Anlagerung erkennbar bzw. es fehlte der $[M + H]^+$-Peak völlig.

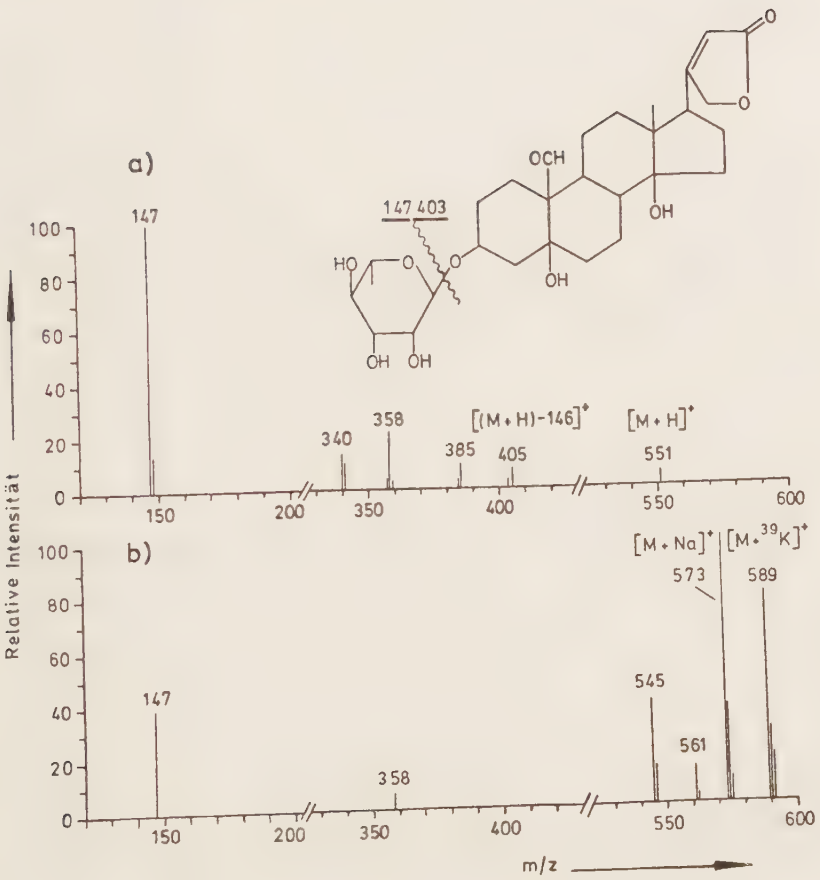


Abb. 43
FD-MS von Convallatoxin (MG 550.66)
a) ohne Zugabe b) nach Zugabe von NaCl

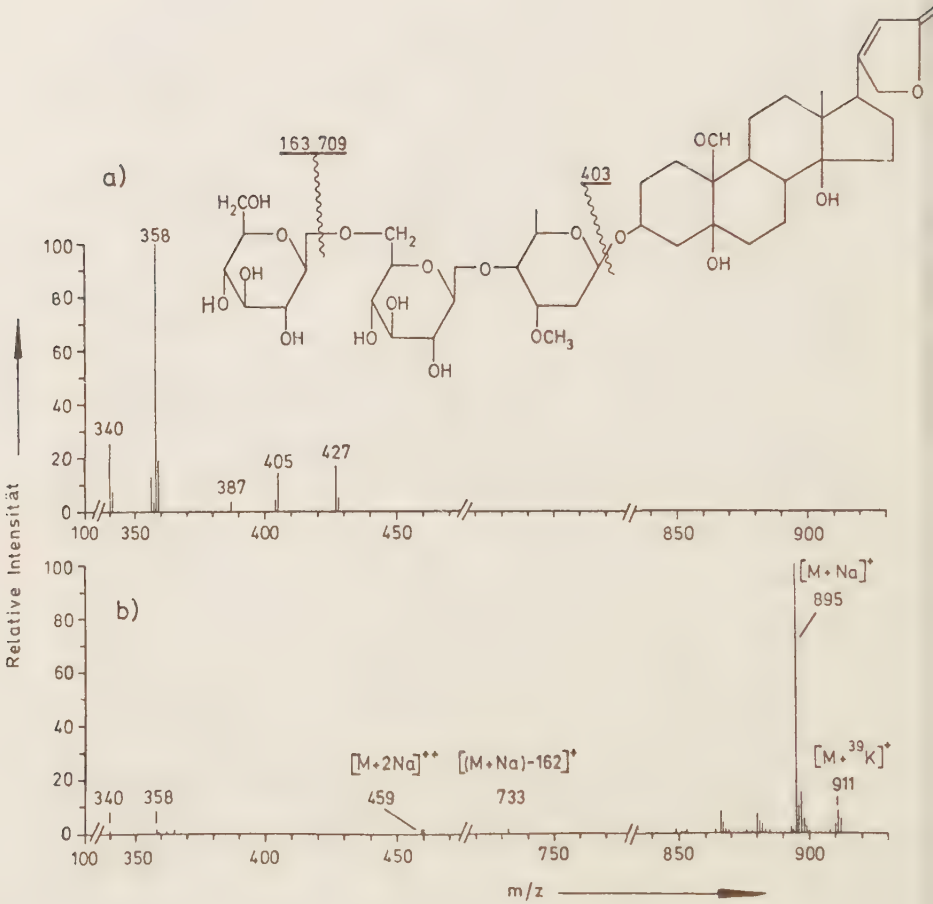


Abb. 44

FD-MS von k-Strophanthosid (MG 872.97)

a) ohne Zugabe b) nach Zugabe von NaCl

Eine interessante neue Variante stellt die gekoppelte Desorptions/Chemische Ionisations-MS-Technik (D/IC) dar [70]. Dabei erfährt die unverdampft desorbierte Probe eine chemische Ionisation durch Ammoniakgas. Statt eines Protonentransfers (FD) beobachtet man einen "stabilisierten Stoßkomplex" $[ROH/NH_4]^+$ [71]. Dieser Effekt findet sowohl beim Glykosid als auch bei Fragmenten statt, wie am Beispiel des Hellebrins gezeigt werden konnte. Beide Techniken wiesen nur geringe Tendenz zur Fragmentbildung auf. Die FD-Methode scheint auf Grund der gleichzeitigen Anlagerungsmöglichkeit verschiedener Kationen (Li^+, Na^+, K^+) die schlüssigere Variante darzustellen. Im Gegensatz zur FD-MS übt die gleichzeitige Anwesenheit von Alkalisalzen keinen Einfluß aus.

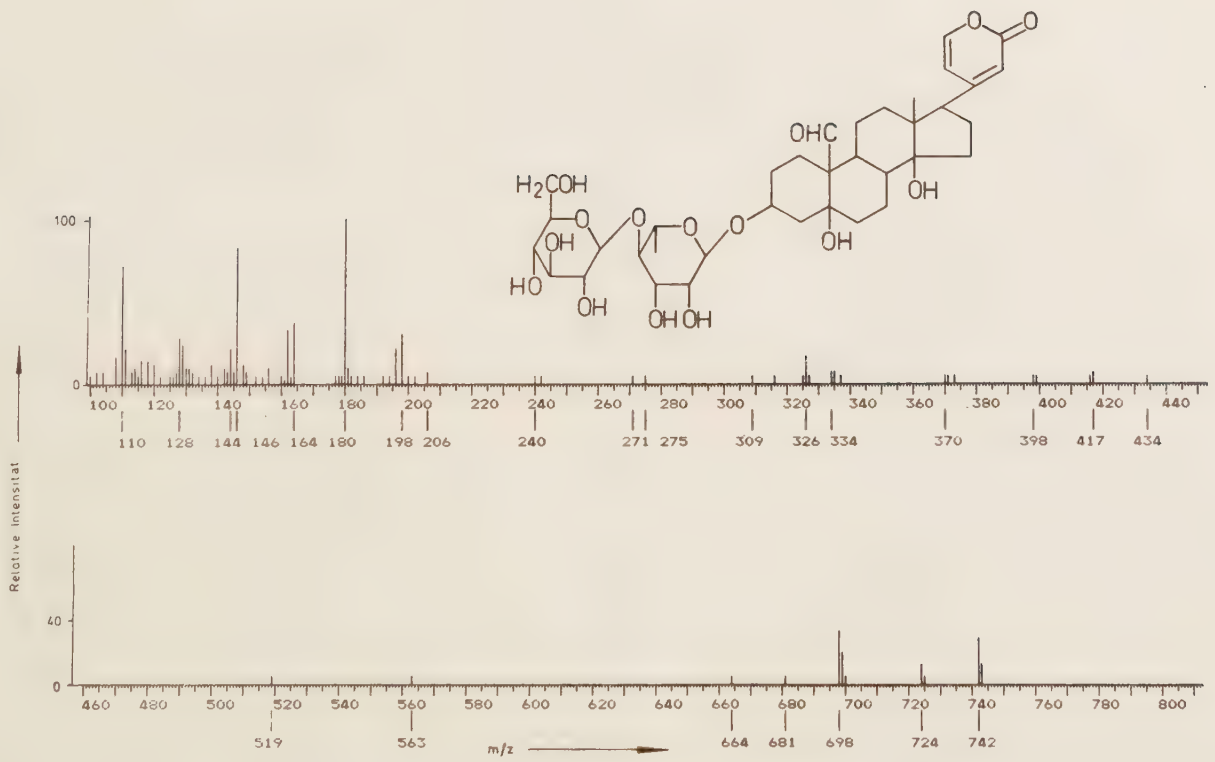


Abb. 45

D/IC-MS von Hellebrin (MG 724.82)

4.2. Zuckeranalyse mit dem Zuckeranalysator [78]

Die Identifizierung von selten vorkommenden, zum Teil miteinander isomeren Zuckern bereitet bei Vorliegen geringer Glykosidmengen, wie gezeigt wurde, auch heute noch große Schwierigkeiten. Die Zuckeridentifizierung erfolgte bisher meist durch kombinierte Anwendung von DC, PC und Hochspannungselektrophorese, wobei man auf Vergleichszucker angewiesen war, da die R_f-Werte der Literatur ohne diese kaum reproduzierbar waren. Zusätzliche Hilfsmittel stehen heute in der FD-MS- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie zur Verfügung. Sie reichen aber nicht aus, um eine eindeutige Zuordnung im Mikromaßstab zu treffen. Es war daher notwendig, ein standardisierbares System zu entwickeln, das die sichere Identifizierung bei Vorliegen von Mikromengen ermöglicht. In der automatisierten Zuckeranalyse durch Chromatographie an einem Boratkomplexionenaustauscher [72-77] steht eine solche Methode zur Verfügung. Um die Brauchbarkeit zur Identifizierung aller 8 isomeren 6-Desoxyhexosen zu testen, wurden diese Zucker nach der in Tabelle 27 angegebenen Weise beschafft. Spätere Untersuchungen sollten mit höchstens 2 Vergleichszuckern auskommen.

In der folgenden Tabelle sind Herkunft bzw. Herstellung der Vergleichszucker angegeben:

Tabelle 27: Herkunft der Vergleichszucker

Chem.Bezeichnung	Trivialnamen [109]	Herkunft
6-Desoxy-D-allose	D-Allomethylose	Hydrolyse von Strophallosid +)
6-Desoxy-D-altrose	D-Altromethylose	aus 2,2,4-Tri-O-acetyl-α-methyl-6-desoxy-D-altropyranosid 108) +)
6-Desoxy-D-galactose	D-Galactomethylose, D-Fucose, Rhodeose	Fa.ROTH, Karlsruhe
6-Desoxy-D-glucose	D-Glucomethylose, D-Chinovose, D-Isorhamnose, Isorhodeose, D-Epirhamnose	Hydrolyse von Orizabinsäure B 43)
6-Desoxy-L-glucose	L-Glucomethylose, L-Chinovose	Epimerisierung von L-Rhamnose 42)
6-Desoxy-D-gulose	D-Gulomethylose, Antiarose	Hydrolyse von Descheirotoxin
6-Desoxy-L-idose	L-Idomethylose	+)
6-Desoxy-L-mannose	L-Mannomethylose, Rhamnose, Isodulcit, Lokaose	Fa.MERCK, Darmstadt
6-Desoxy-L-talose	L-Talomethylose, Epifucose	Hydrolyse von Sarmentosid A +)

+) Prof.T.Reichstein, Basel

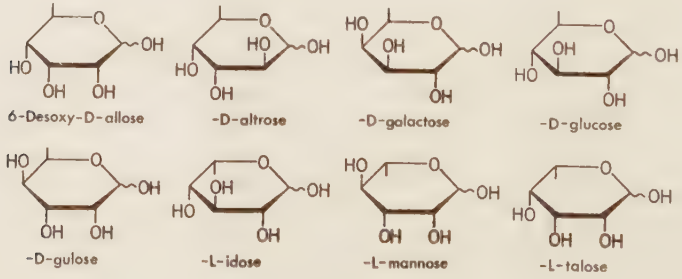


Abb. 46
Formelübersicht über die 6-Desoxyhexosen

Im angegebenen Trennsystem (siehe Exper.Teil, S.126) gelang die Trennung aller beschriebenen 6-Desoxyzucker in einer Zeit von 2 1/4 Stdn. Allerdings zeigten die beiden Enantiomeren der 6-Desoxyglucose identisches Laufverhalten. Die Unterscheidung zwischen 6-Desoxygulose und -talose gelingt mit Hilfe von Rhamnose als Leitsubstanz. Ihre Identität kann gegebenenfalls durch Zumischen im zweiten Durchlauf bewiesen werden. Als zweiter leicht erhältlicher Zucker zur Eichung der relativen Retentionszeit ist Glucose vorgesehen.

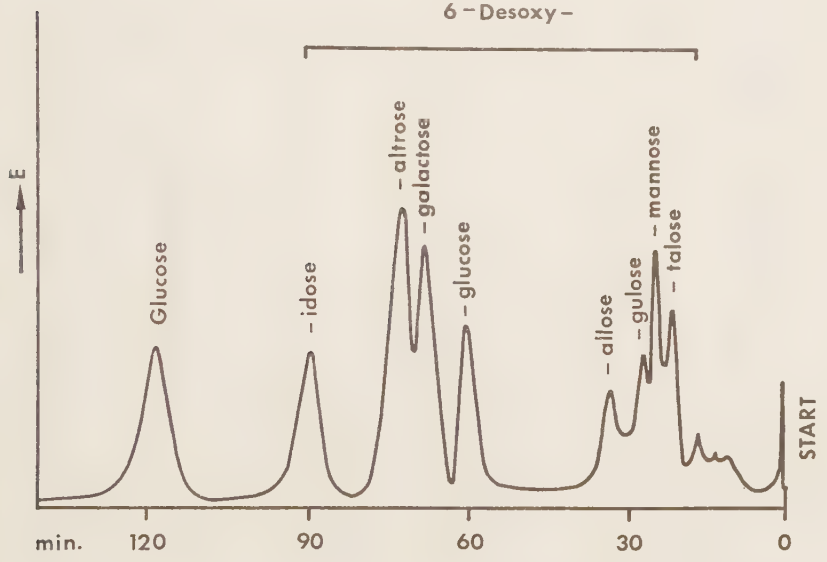


Abb. 47
Trennschema 6-Desoxyhexosen

Auch Hexosen können unter den angegebenen Bedingungen mit Ausnahme von Allose, Galactose und Talose unterschieden werden. Die 8 isomeren Hexosen sind im Handel erhältlich.

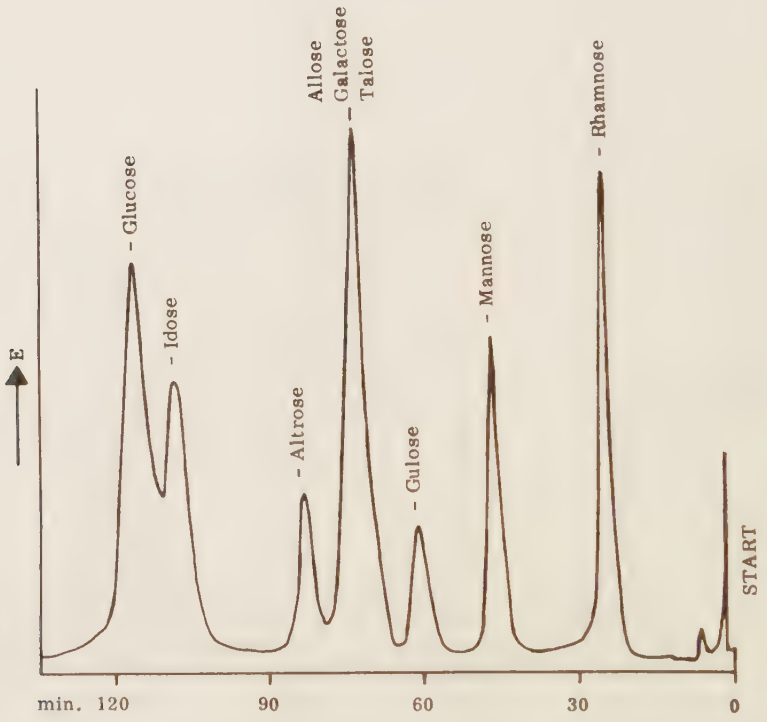


Abb. 48
Trennschema Hexosen

Tabelle 28: Gegenüberstellung der relativen Retentionszeiten am ZA und der relativen R_f-Werte bei DC

Zucker	$\frac{t_{R\ Zu}}{t_{R\ Rha}}$	$\frac{R_{f\ Zu}}{R_{f\ Rha}}$
Glucose	4.92	0.68
Idose	4.47	0.82
6-Desoxyidose	3.71	1.16
Altrose	3.37	0.78
Galactose	3.02	0.61
Allose	3.02	0.71
Talose	3.02	0.73
6-Desoxyaltrose	2.96	1.10
6-Desoxygalactose	2.83	0.83
6-Desoxyglucose	2.58	1.00
Gulose	2.52	0.70
Mannose	1.66	0.76
6-Desoxyallose	1.33	1.04
6-Desoxygulose	1.08	1.00
6-Desoxymannose	1.00	1.00
6-Desoxytalose	0.88	1.06

$t_{R\ Zu}$ = Retentionszeit des Zuckers im ZA

$t_{R\ Rha}$ = Retentionszeit der Rhamnose im ZA

DC: Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) (Kieselgel)

In jedem Fall muß vor einer ZA-Analyse geklärt werden, ob eine 6-Desoxyhexose oder Hexose vorliegt.

Die Methode der automatisierten Zuckeranalyse erlaubt auch eine quantitative Aussage auf graphischem Weg. Dazu werden zuvor ermittelte zuckerspezifische Eichkoeffizienten (Gehalt/Fläche) zu den gefundenen Peakflächen in Beziehung gesetzt.

4.3. HPLC-Untersuchungen

4.3.1. Analytische und semipräparative Trennung der Cardenolide von Lophopetalum toxicum durch HPLC

Für eine HPLC-Trennung der Cardenolide von Lophopetalum toxicum eignete sich das System 20% Acetonitril/Wasser ("reversed-phase"-Bedingungen). Nur bei den Antiarigeninglykosiden war es notwendig, den Acetonitril-Anteil auf 10% zu reduzieren[132].

Ein durch Extraktion mit 50%igem Äthanol und anschließender Bleifällung gewonnener Extrakt ergab folgendes Liquidchromatogramm (S.102):

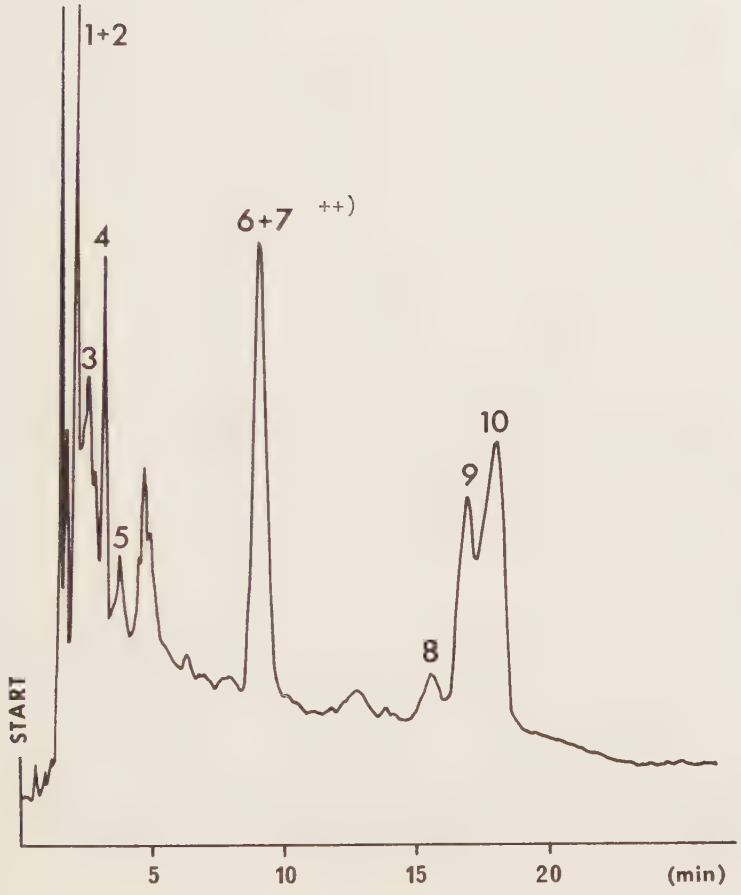


Abb. 49

Liquidchromatogramm eines Extrakts von Lophopetalum toxicum +)

1 = Antiarigeninalloallomethylosid
2 = Antiarigeningulotalomethylosid
3 = β-Antiarin
4 = Antiallosid
5 = Antiarigenin
6 = Strophanthidinalloallomethylosid
7 = Strophanthidinglucotalomethylosid
8 = k-Strophanthidin
9 = Strophanthidinchinovosid
10 = Strophallosid

+) Trennsystem 20% Acetonitril/Wasser
++) Trennung von 6 und 7 gelang im Trennsystem 15% Acetonitril/Wasser

Die Identität folgender Lophopetalum-Cardenolide konnte mit Hilfe von Vergleichssubstanzen bestätigt werden:

Cardenolide in Lophopetalum toxicum	Vergleichssubstanzen
A	k-Strophanthidin
C	Antiarigenin
D 1	Strophallosid
D 2	synthet.Strophanthidin-chinovosid
D 3	Antiallosid
D 4	β-Antiarin

Im System 10% Acetonitril/Wasser gelang eine semipräparative Trennung der Glykoside G 1 und G 2 durch ein mehrmaliges Recycling-Verfahren [133].

4.3.2. Vergleich HPLC-DC

Glykoside:

Bei der "reversed-phase"-HPLC-Trennung und der DC-Trennung auf Kieselgelplatten werden bei gleichem Aglykon die zuckerärmeren Glykoside später eluiert bzw. zeigen höhere R_f-Werte als die zuckerreicheren Glykoside. Die Retentionen der getrennten Monoglykoside sind analog der R_f-Folge. Descheirotoxin bei der DC und Strophanthidinchinovosid bei der HPLC bilden die Ausnahme. Während bei der DC die Diglykoside in der Reihenfolge Strophanthidinalloallomethylosid (rel. R_f = 0.46) [+] - Strophanthidinglucotalomethylosid (0.41) bzw. Antiarigeningulotalomethylosid (0.35) - Antiarigeninalloallomethylosid (0.31) getrennt werden, erfolgt die Elution bei der HPLC in umgekehrter Weise.

Das HPLC-Verhalten von k-Strophanthosid ist verschieden von dem bei der DC. Das Strophanthidintriglykosid verläßt erst nach den beiden Diglykosiden Strophanthidinalloallomethylosid und -glucotalomethylosid die Säule.

+) $\text{rel.}R_f = \frac{R_f \text{ Substanz}}{R_f \text{ Convallatoxin}}$

Aglykone:

Die R_f-Werte (DC) und relativen Retentionszeiten (HPLC) nehmen bei Vorliegen gleicher Zucker im Glykosid mit der Substitution an C-10 der Aglykone in der Reihenfolge $-CH_2OH \longrightarrow -CHO \longrightarrow -CH_3$ zu, z.B. Sarmentosid A (0.98) ⟶ Bipindosid (1.08), Strophanollosid (0.91) ⟶ Strophallosid (1.12), Convallatoxol (0.85) ⟶ Convallatoxin (1.00). Bei Ersatz von -CHO durch eine $-CH_2OH$-Gruppe, wie in Convallatoxin (1.00) ⟶ Convallatoxol (0.85), Strophallosid (1.12) ⟶ Strophanollosid (0.91), nehmen die R_f-Werte oder relativen Retentionen weniger ab, als bei einer -CHO-Gruppe am C-10 und einer zusätzlichen -OH-Gruppe am C-12 (Convallatoxin (1.00) ⟶ β-Antiarin (0.75), Strophallosid (1.12) ⟶ Antiallosid (0.87). Nach dem DC-Laufverhalten nimmt die Polarität bei sonst gleicher Molekülstruktur für -OH-Gruppen in der Reihenfolge C-12- ⟶ C-11- ⟶ C-5- ⟶ C-16- ab (Antiallosid (0.87) ⟶ Sarmentosid A (0.98), β-Antiarin (0.75) ⟶ Thollosid (0.85), Gamabufotalin ++) ⟶ 12β-Hydroxybufalin ++), Sarmentogenin ++) ⟶ Periplogenin ++), Digoxigenin ++) ⟶ Gitoxigenin ++), Convallatoxin (1.00) ⟶ Adonitoxin (1.16)). Abweichend davon werden bei der HPLC die Glykoside mit C-16- und C-5-Hydroxysubstitution in der Reihenfolge C-12 ⟶ C-16 ⟶ C-5 eluiert. Z.B. erscheint Adonitoxin vor Convallatoxin. C-12-OH-Glykoside werden wie bei der DC vor solchen mit C-11-OH eluiert.

Ein Vergleich mit der dünnschichtchromatographischen Zuckertrennung (siehe S. 100) zeigt bis auf wenige Ausnahmen bei gleichem Aglykon übereinstimmende Trennreihenfolge der Glykoside bei DC und HPLC mit der der Zucker. (siehe Tab. 29, S. 105).

++) Siehe Lit. 134)

Tabelle 29: Vergleich der relativen Retentionen und DC-R_f-Werte von Cardenoliden im System Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) auf Kieselgelplatten

Verbindung	HPLC		DC
	20% CH_3CN rel.Ret.	10% CH_3CN rel.Ret.	rel.R_f
g-Strophanthin	0.17	1.00	0.39
Antiarigeningulotalomethylosid (G 1)	0.17	1.17	0.35
Antiarigeninalloallomethylosid (G 2)	0.17	1.33	0.31
β-Antiarin (D 4)	0.21	1.50	0.75
Antiallosid (D 3)	0.23	2.14	0.87
Thollosid	0.24		0.85
Antiarigenin (C)	0.24		1.21
Sarmentosid A	0.32		0.98
Bipindosid	0.36		1.08
Adonitoxin	0.61		1.16
Strophanthidinalloallomethylosid (E)	0.71		0.46
Strophanthidinglucotalomethylosid (F)	0.71		0.41
k-Strophanthosid	0.77		0.25
Convallatoxol	0.77		0.85
k-Strophanthin-β	0.95		0.68
Convallatoxin	1.00		1.00
Strophanollosid	1.03		0.91
k-Strophanthidin (A)	1.10		1.48
Descheirotoxin	1.24		1.14
Strophanthidinchinovosid (D 2)	1.40		0.96
Strophallosid (D 1)	1.50		1.12
Helveticosid	2.03		1.31
Cymarin	3.73		1.43

5. Pharmakologische Untersuchungen

5.1. Prüfung auf Antitumorwirksamkeit am P 388-Modell und Nasopharynx-Epidermis-System

Untersucht wurden zwei nach der Vorschrift des NCI +) hergestellte Extrakte von Lophopetalum toxicum (siehe Exper.Teil 2.7.2.1., S. 129). Es wurde als erstes eine in vivo-Versuchsreihe an weiblichen Mäusen mit P 388-Lymphozyten-Leukämie durchgeführt. Diese wurde bei positivem Ergebnis an männlichen Mäusen wiederholt. Eine Hemmung des Zellwachstums war signifikant, wenn am 4.Versuchstag der Quotient aus der mittleren Überlebensdauer der Testgruppentiere (T) und der Kontrollgruppentiere (C) T/C $\geqq$ 125% betrug.

Tabelle 30: Ergebnisse des in vivo-Screenings von Lophopetalum toxicum-Extrakten.

Extraktbezeichnung	Dosis/Inj. in mg/kg	Tumorbewertung Testgruppe	Tumorbewertung Kontrollgruppe	T/C in %
		weibliche Mäuse		
Äthanolextrakt NSC B 83 85 77	400	2.2	10.2	-
	200	9.9	10.2	97
	100	12.7	10.2	124
Chloroformextrakt NSC B 83 85 78	400	10.4	10.2	101
	200	10.3	10.2	100
	100	10.7	10.2	104
		männliche Mäuse		
Äthanolextrakt NSC B 83 85 77	150	0	10.5	-
	100	12.1	10.5	115
	65	11.0	10.5	104
	45	11.9	10.5	113

+) National Cancer Institut, Bethesda, Maryland, USA

Wie aus der Tabelle hervorgeht, besitzt der Äthanolextrakt gegenüber dem P 388-System an weiblichen Mäusen eine signifikante Wirkung. Bei männlichen Tieren lag die Wirksamkeit unter dem geforderten Wert von T/C $\geqq$ 125%. Der Chloroformextrakt zeigte hingegen an weiblichen Tieren nur minimale Hemmung. Er wurde deshalb an männlichen nicht mehr getestet. Auf Grund der hohen Toxizität des Äthanolextraktes (intraperitoneale Applikation) konnte die stärkste Hemmwirkung nur bei geringerer Dosierung beobachtet werden.

Anschließend wurden die gleichen Extrakte in vitro an Zellkulturen von menschlichem Nasopharynx-Epidermis Carcinom getestet. Hier wird bei einer ED_{50} $\leqq$ 20 µg/ml als Grenzdosis eine 50%ige Wachstumshemmung gefordert. Eine erste Testreihe des Äthanolextraktes am KB-System ergab mit ED_{50}-Werten zwischen 1.5 und 10 µg/ml eine Wirksamkeit. In der Wiederholung konnte diese Wirksamkeit mit Werten von 30 und 38 µg/ml jedoch nicht mehr erreicht werden. Der Chloroformextrakt war mit 56 µg/ml eindeutig unwirksam.

5.2. Prüfung auf Cytotoxizität durch den ^{3}H-Thymidin-Einbautest an Asciteszellen [79]

Hier wird in vitro (Ausführung siehe S. 130) die Einbauhemmung in % bestimmt. Getestet wurden der im NCI-Test wirksame Äthanolextrakt, Fraktionen des Trennungsganges sowie isolierte Glykoside und Vergleichssubstanzen. Mit einer Hemmung von 65% stand der Äthanolextrakt in Einklang mit dem NCI-Ergebnis. Die aus der Glykosidanreicherung resultierenden Fraktionen A 1, E und F (siehe Trennungsgang), sowie die Glykoside Strophanthidinalloallomethylosid und -glucotalomethylosid zeigten signifikante Hemmwerte zwischen 60 und 90.2%. Aus dem Vergleich mit k-Strophanthin und Convallatoxin konnte gefolgert werden, daß die Wirkung der Extrakte im wesentlichen auf die bekannte Cytotoxizität der Steroidlactone zurückzuführen war.

Viele herzglykosidhaltige Pflanzen sind als cytotoxisch beschrieben. Eine Übersicht über die Aktivität von Steroidlactonen und ihren Aglykonen gibt HARTWELL 80). KUPCHAN 81) fand bei Sesquiterpenlactonen als Voraussetzung für ihre cytotoxische Wirksamkeit die Anwesenheit einer α-Methylen-γ-Lacton-Gruppierung. Zusätzliche α,β-ungesättigte Carbonylfunktionen erhöhen die Aktivität. Die Herzglykoside entsprechen diesen Strukturmerkmalen. Die cytotoxische Wirkung ist ausschließlich an das Aglykon gebunden 82).

Da die Hemmwerte der Extraktfraktionen teilweise höher als die der Reinsubstanzen lagen und die cardenolidfreie Fraktion B/PAS 9+) sogar eine extrem hohe Hemmung von 97.7% ergaben, muß in der Lophopetalumdroge noch ein zweites nicht an die Herzglykoside gebundenes cytotoxisches Wirkprinzip vorhanden sein.

Tabelle 31: Hemmung des ^{3}H-Thymidin-Einbaus durch Fraktionen und Glykoside 110)

	Hemmung in %	Datum
Äthanolextrakt	65.0	19. 5.78
Fraktion A 1++)	69.4	18. 7.78
Fraktion E++)	74.4	18. 7.78
Fraktion F++)	90.2	18. 7.78
Strophanthidinallo-allomethylosid	63.0	7.12.79
Strophanthidingluco-talomethylosid	60.0	7.12.79
k-Strophanthin	84.7	18. 7.78
Convallatoxin	81.4	18. 7.78
Fraktion B/PAS 9++)	97.7	18. 7.78

++) Fraktion A 1, Fraktion E, Fraktion F und Fraktion B/PAS 9 sind Bezeichnungen der Fraktionen des Trennungsganges

+) Zur Anreicherung von A = k-Strophanthidin wurde Fraktion B des Trennungsganges über eine Polyamidsäule mit Wasser in 10 Fraktionen aufgetrennt. Die cardenolidfreie Fraktion 9 wurde getestet.

5.3. Prüfung auf positiv inotrope Wirkung

Die Wirksamkeitsprüfung von Herzglykosiden erfolgte früher durch Bestimmung der letalen Dosis an Fröschen, Meerschweinchen oder Katzen, wobei Herzwirksamkeit und Toxizität gleichgesetzt wurden. Herzwirkung der Glykoside und Hemmeffekt auf das Adenosintriphosphat-Phosphohydrolase-System, das im Herzmuskel für den aktiven Transport von Na^+ und K^+ durch die Zellmembran verantwortlich ist, stehen miteinander in Beziehung 83).

Bewährt hat sich für Screening-Untersuchungen und das Auffinden von cardiotonen Wirkprinzipien von Pflanzen die Versuchsanordnung von REITER [14], die am isolierten Papillarmuskel des Meerschweinchens durchgeführt wurde (siehe EXPERIMENTELLEN TEIL, S. 128). Sie erlaubt u.a. die Angabe der halbmaximalen Herzwirksamkeit ED_{50}, wobei die Substanz direkt aus dem Organbad an die Rezeptoren des Muskels gelangt. Resorption, Transport und Metabolisierung beeinflussen daher das Ergebnis nicht. Der Polaritätscharakter ist nur für die Löslichkeit im Organbad von Bedeutung. Die isometrischen Spannungskurven (z.B. Abb. 50) geben den Anstieg der Muskelkontraktionskraft an.

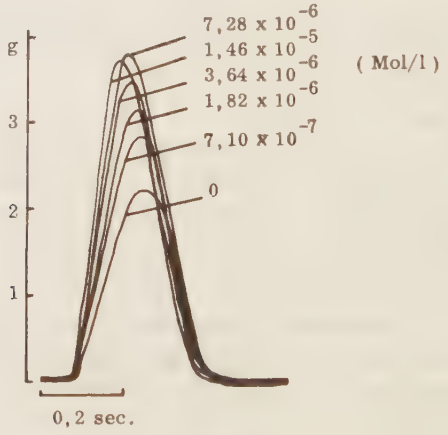


Abb. 50

(g = Muskelkontraktionskraft ohne Substanzzugabe)

Aus der graphischen Darstellung des Anstiegs der Muskelkontraktionskraft in % aufgetragen gegen die Konzentration der Substanz in Mol/l kann die ED_{50} entnommen werden.

Die Abbildung 51 enthält die Dosiswirkungskurven für alle untersuchten Glykoside.

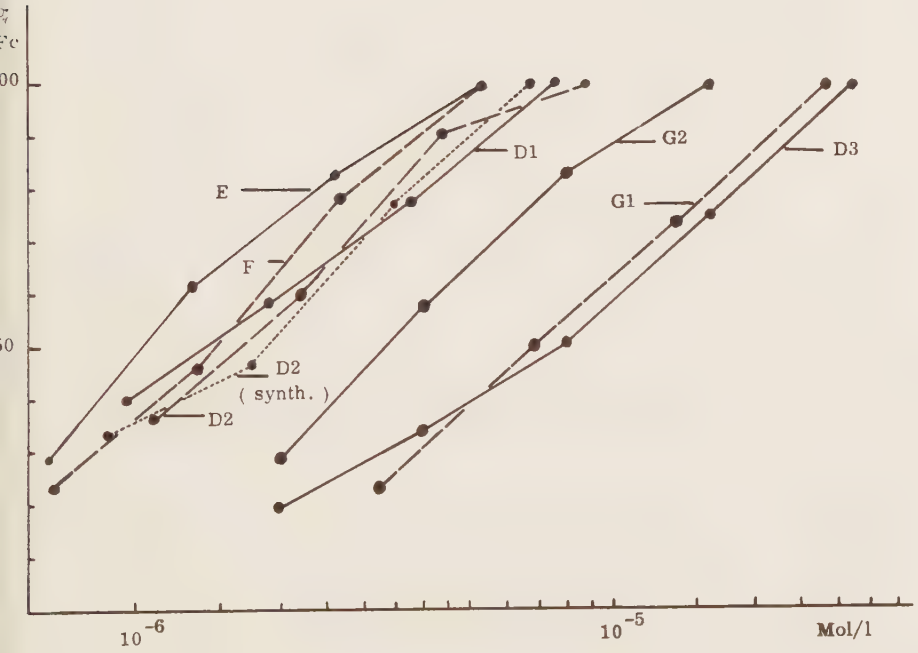


Abb. 51

Dosis-Wirkungskurven der Glykoside D 1 - D 2 - D 2 synth. - - D 3 - E - F - G 1 - G 2

Tabelle 32: Ergebnisse der Tests auf positiv inotrope Wirkung

Glykoside aus Lophopetalum toxicum	ED_{50} x 10^{-6} Mol/l	△Fc in mg
D 1 = Strophallosid	1.38	1575
D 2 = Strophanthidinchinovosid	1.65	1375
(D 2 synthetisch	1.88	1125)
D 3 = Antiallosid	7.80	1525
E = Strophanthidinalloallo-methylosid	1.05	2100
F = Strophanthidinglucotalo-methylosid	1.45	1300
G 1 = Antiarigeningulotalomethylosid	6.7	2025
G 2 = Antiarigeninalloallomethylosid	3.3	600

△Fc = Anstieg der Muskelkontraktionskraft

Aus den Graphiken und der Tabelle geht hervor, daß kein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit von Mono- und Diglykosiden besteht. Der Vergleich der Glykoside mit den Aglykonen k-Strophanthidin und Antiarigenin weist die ersten als deutlich aktiver aus. Der abweichende Wert von Antiarigeninalloallomethylosid ist möglicherweise auf das geringe Ansteigen der Muskelkontraktionskraft bis zum Erreichen der Toxizität zurückzuführen.

Die positiv inotrope Wirkung der Lophopetalumglykoside liegt verglichen mit der anderer Cardenolide wie Convallatoxin oder k-Strophanthosid ungefähr im gleichen Wirkbereich. Die teilweise ungewöhnlichen Lophopetalumzucker üben in dieser Versuchsanordnung offensichtlich keinen signifikanten Einfluß aus.

Die Herzwirksamkeit des alkoholischen Extrakts von Lophopetalum toxicum ist geringer als die anderer herzglykosidhaltiger Drogen, wie z.B. der Samen von Strophanthus-Arten und der Rinde von Lophopetalum wightianum (siehe Allg.Teil 6.1., S. 114).

6. Chemische und pharmakologische Untersuchungen an anderen Lophopetalum-Arten

6.1. Lophopetalum wightianum ARN. (Drogenmuster Bl 2)

Folgende synonyme Bezeichnungen für Lophopetalum wightianum existieren [84]:

Lophopetalum macrocarpum (PIERRE), L. fimbriatum (WIGHT), L. winkleri (LOES), Euonymus fimbriatus (BAILL.).

Die Stammrinde wurde im Juni 1980 in Indien gesammelt. Sie enthält Lupeol und findet als Fischgift Verwendung, wobei die Fische genießbar bleiben. Das Rindenpulver ergab beim Schütteln mit Wasser nur wenig weißen Schaum (ähnlich L.toxicum). Im Gegensatz zu L. toxicum war kein bitterer Geschmack feststellbar.

Das methanolische Kaltmazerat ergab bei L. wightianum eine dunkelbraune Lösung und 6.5% Trockenextrakt, bei L. toxicum eine gelbliche Lösung und nur 2.1% Trockenextrakt. Im DC-Bild (Detektionsmittel: KEDDE, H_2SO_4 85%, $SbCl_3/CHCl_3$) zeigen beide Extrakte Ähnlichkeit im Inhaltsstoffmuster. L. wightianum enthält mindestens 4 KEDDE-positive Substanzen. Sie waren chromatographisch nicht von k-Strophanthidin (A), Strophallosid (D 1), Strophanthidinchinovosid (D 2) und Antiallosid (D 3) unterscheidbar.

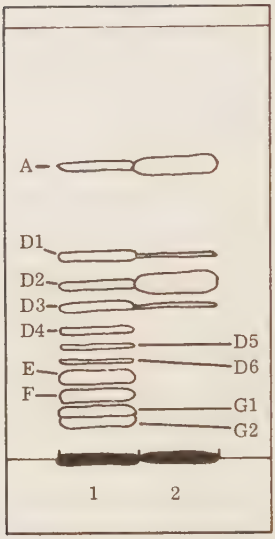


Abb. 52
DC-Vergleich Lophopetalum toxicum - L. wightianum

1 = Lophopetalum toxicum, Methanolextrakt
2 = Lophopetalum wightianum, Methanolextrakt

Laufmittelsystem: Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser
(100:5:13,4:10) (Kieselgel)

Detektion: KEDDE-Reagenz

D 4 = β-Antiarin (DC-Id.)

D 5
D 6 = unbekannte Struktur

E - G siehe Allg.Teil 3.4. - 3.7.

Der Beweis für die Identität des Strophanthidinchinovosids in L. wightianum wurde durch HPLC-Untersuchung erbracht (Bedingungen siehe Allgem.Teil 4.3., S. 101). Überspritzen des Extraktes mit authentischem Strophanthidinchinovosid aus L. toxicum führte zu einer eindeutigen Peakvergrößerung.
Der Gehalt an Strophanthidinchinovosid lag in L. wightianum bedeutend höher als in L. toxicum, auch k-Strophanthidin war in höherem Maß vertreten.

Wie in L. toxicum konnten auch in L. wightianum Alkaloide nachgewiesen werden. Der methanolische Extrakt wies im Laufmittelsystem Toluol-Äthylacetat-Methanol (6:4:1) bei beiden Drogen die beiden gleichen DRAGENDORFF-positiven Flecken bei R_f = 0.91 und 0.82 auf, mit intensiverer Färbung bei L. toxicum. VALSER'S Reagenz führte dagegen bei L. wightianum zu stärkerer Trübung. Absolut betrachtet enthalten beide Drogen jedoch nur Spuren von Alkaloiden.

Der Extrakt von L. wightianum war im Test am isolierten Papillarmuskel deutlich wirksamer als der von L. toxicum. Während bei L. toxicum 7 mg Extrakt eine ED_{50} bewirkten ($\triangle$ Fc = +550 mg bei 32 mg Extrakt), genügten bei L. wightianum 5.8 mg ($\triangle$Fc=+700 mg bei 32 mg Extrakt).

Der Methanolauszug von L. wightianum wies eine 75.6%ige Hemmung der ^{3}H-Thymidin-Einbaurate an Asciteszellen auf.

Eine weitergehende Bearbeitung der Droge erfolgt derzeit [111].

6.2. Lophopetalum arnhemicum N.BYRNES (Drogenmuster Bl 3)

Die australische Art Lophopetalum arnhemicum wurde erst 1971 systematisch eingeordnet [85]. Sie ist die einzige Vertreterin der Gattung Lophopetalum in Australien und kommt ausschließlich im Norden des Kontinents, im "ARNHEM LAND" vor.

Für Untersuchungen standen uns sowohl Rinden- als auch Blattdroge zur Verfügung +).

+) gesammelt von Frau Dr.S.Bladt im Juni 1977 in der Gegend des "ALLIGATOR RIVER".

Nur das Rindenpulver ergab eine positive Schüttelschaumprobe mit über 5 Stdn. stabilem Schaum.

Die äthanolischen Extrakte aus Blatt- und Rindendroge enthielten keine KEDDE-positiven Substanzen oder Alkaloide. Während in den Rindendrogen weder von L. toxicum und L. wightianum, noch von L. arnhemicum Flavonoide nachweisbar waren, fanden sich in den Blättern von L. arnhemicum mindestens 11 flavonoide Verbindungen. Die mit Naturstoffreagenz detektierte Platte (Laufmittel siehe S.123) zeigte ausschließlich gelborange bis orange Fluoreszenzen. Identifiziert wurden Rutin und Hyperosid. Bei den anderen Flavonoiden handelt es sich vermutlich um Glykoside des Quercetins. Quercetin, Vitexin und Chlorogensäure sind nicht vorhanden. Im Screening des NCI auf Antitumorwirksamkeit erfüllten die Extrakte die geforderten Kriterien von T/C $\geq$ 125% und ED_{50} $\leq$ 20 µg/ml nicht.

Tabelle 33: Ergebnisse des NCI-Tests von Lophopetalum arnhemicum

Pflanzenteil	Probenbezeichnung	T/C %	ED_{50} µg/ml
Blätter	Äthanolextrakt NSC B 83 88 14	102	25
	Chloroformextrakt NSC B 83 88 15	108	25
Rinde	Äthanolextrakt NSC B 83 88 16	113	26
	Chloroformextrakt NSC B 83 88 17	111	27

(Erläuterung siehe S. 106)

7. Übersicht über die bisher in Celastraceen gefundenen Herzglykoside [88]

Innerhalb der Familie der Celastraceen konnten bisher nur in den Gattungen Elaeodendron , Euonymus und Lophopetalum Herzglykoside nachgewiesen und ihre Strukturen aufgeklärt werden. Sie gehören alle zur Cardenolid-Reihe.

Tabelle 34: Cardenolide aus Celastraceen

Vorkommen	Struktur (Trivialname)	Smp.	Lit.
Euonymus europaeus L. (Samen)	Digitoxigenin-3-O-α-L-rha (Evomonosid)	238-240°	112)
	Digitoxigenin-3-O-L-rha-D-glu (Evobiosid)	202-206°	117)
	Digitoxigenin-3-O-L-rha-D-glu-D-glu (Evonosid)	203-208°	116)
	1β,3β,5β,14β-tetrahydroxy-card-20(22)-Enolid ("Evonogenin")	273-276°	115)
	Evonogenin-3-O-β-D-glu ("Glucoevonogenin")	212-220°	114)
	Cannogenol-3-O-α-L-rha (Evonolosid)	-	113)
	Cannogenol-3-O-α-L-rha-β-D-glu (Glucoevonolosid)	-	114)
Euonymus atropurpurea JACQ.(Wurzeln)	Digitoxigenin-digitoxosid ("Kristallisat A")	186-194°	118)
	Digitoxigenin-3-O-arabinosid (Euatromonosid = (Evatromonosid)	181-186°	118)
	Digitoxigenin-3-O-ara-β-glu (Euatrosid = Evatrosid)	-	119)
Euonymus medirossica KISLICH. (Samen)	Digitoxigenin-3-β-O-α-L-rhamnopyranosyl-4'-O-β-D-glucopyranosyl-6"-O-β-D-glucopyranosid (Euonosid)	-	120)
Elaeodendron glaucum PERS. (Samen)	Elaeodendrogenin	258-262°	121)
	Elaeodendrosid A	299-300°	122)
	Elaeodendrosid B	252-257°	121)
	Elaeodendrosid C	233-236°	121)

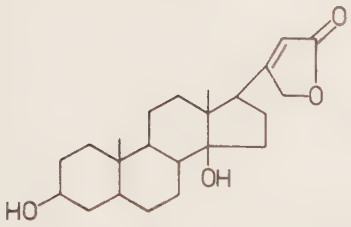
Fortsetzung Seite 117

Fortsetzung Tabelle 34:

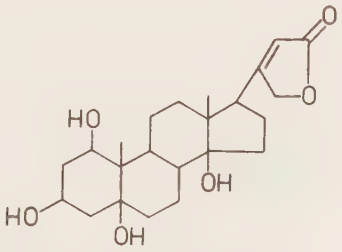
Vorkommen	Struktur (Trivialname)	Smp.
Lophopetalum toxicum LOHER (Rinde)	[x]k-Strophanthidin	139-142°
	k-Strophanthidin-3-β-D-β-6-desoxy-D-allopyranosid (Strophallosid)	170-174°
	k-Strophanthidin-3-β-D-β-6-desoxy-D-glucopyranosid (Strophanthidinchinovosid)	168-175°
	k-Strophanthidin-3-β-D-[4-O-β-D-allopyranosyl-β-6-desoxy-D-allopyranosid]	187-192°
	k-Strophanthidin-3-β-D-[3-O-β-D-glucopyranosyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid]	201-205°
	[x]Antiarigenin	247-249°
	Antiarigenin-3-β-D-β-6-desoxy-D-allopyranosid (Antiallosid)	227-230°
	[x]Antiarigenin-3-β-D-α-6-desoxy-L-mannopyranosid (β-Antiarin)	240-245°
	Antiarigenin-3-β-D-[3-O-β-D-gulopyranosyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid]	231-235°
	Antiarigenin-3-β-D-[4-O-β-D-allopyranosyl-β-6-desoxy-D-allopyranosid]	215-218°
Lophopetalum wightianum ARN. (Rinde)	[x]k-Strophanthidin	139-142°
	[x]Strophallosid	170-174°
	[x]Strophanthidinchinovosid	168-175°
	[x]Antiallosid	227-230°

([x] = chromatographische Identifizierung)

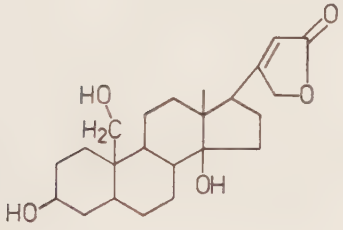
Abb. 53: Formelübersicht über die bisher in Celastraceen aufgefundenen Aglykone:



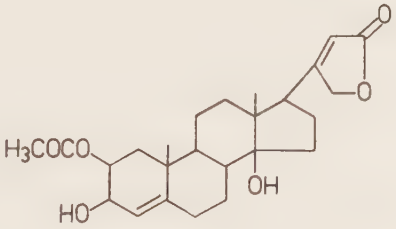
Digitoxigenin



"Evonogenin"

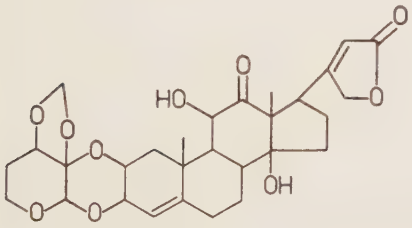


Cannogenol

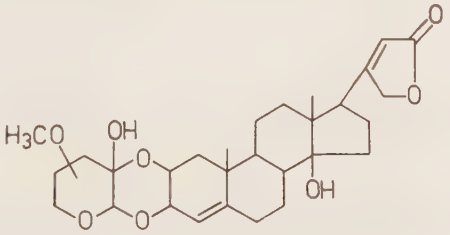


Elaeodendrogenin

Eine neuartige, erst in jüngster Zeit stereochemisch eindeutig zugeordnete Struktur weisen die Elaeodendroside auf:



Elaeodendrosid A



Elaeodendrosid B
Elaeodendrosid C

Die Zuckereinheit ist hier dioxanartig an C-2 und C-3 des Steroidgrundgerüsts gebunden. Eine derartige, für Cardenolide untypische Zuckerverknüpfung wurde bisher erst in wenigen Pflanzenfamilien, vor allem bei Asclepiadaceen, gefunden.

Auch aus einer Apocynacee ist eine Substanz mit einer derartigen Struktur isoliert worden. Unterschiedlich sind im wesentlichen nur Art und Anzahl der Substituenten und Sättigungsgrad innerhalb des Steroidgerüstes.

Übersicht über das Vorkommen von Cardenoliden mit dioxanartiger Zuckerverknüpfung:

Apocynaceae:

Pflanzenart	Cardenolide
Anodendron affine DRUCE [125]	Affinosid B
Anodendron paniculatum ROXB. 126)	Anodendroside A, - E 1, - E 2, - F, - G

Asclepiadaceae:

Pflanzenart	Cardenolide	Pflanzenart
Asclepias eriocarpa BENTH. 138)	Labriformin	Asclepias labriformis 138)
	Labriformidin	
	Eriocarpin	
Asclepias syriaca L.[137]	Syriosid, Syriobiosid	
Asclepias curassavica L. 128,135,136,140)	Asclepin	
	Uscharidin	Calotropis procera R. BR. 123)
	Uscharin	
Pergularia extensa N.E.BR. 139)	Calotropin (Calactin isomer an C-3')	Calotropis gigantea L. 123)
Gomphocarpus fruticosus L. (R.BR.) 124,140) (= Asclepias fruticosa L.)	Gomphosid, Afrosid	

8. ZUSAMMENFASSUNG

Die Stammrinde der philippinischen Celastracee Lophopetalum toxicum LOHER wurde wegen ihrer Verwendung zur Pfeilgiftbereitung einer phytochemischen und pharmakologischen Untersuchung unterzogen.

Die Prüfung von Rindenextrakten und Lösungsmittelfraktionen auf Cytotoxizität am P 388-Mocell (NCI) und positive Inotropie am isolierten Meerschweinchenpapillarmuskel ergaben jeweils signifikante Aktivitäten.

Aus der zur Verfügung stehenden Drogenmenge (1.5 kg) wurden durch Lösungsmittelfraktionierung und chromatographischen Methoden (SC, präp.DC, DCCC) sieben Herzglykoside der Cardenolidreihe isoliert. Davon erwiesen sich fünf Verbindungen als neu. Ihre Strukturaufklärung erfolgte vorwiegend durch Einsatz chromatographischer Verfahren, durch Säureabbau, Felddesorptions-Massenspektrometrie und ^{13}C-NMR-Spektroskopie.

Glykosid D 1 war identisch mit Strophanthidin-3-β-O-β-6-desoxy-D-allopyranosid (Strophallosid), das bereits aus anderen Pflanzenarten isoliert worden war. Neu war das dazugehörige Diglykosid E, das als zweiten Zucker die als Bestandteil von Herzglykosiden bisher unbekannte D-Allose enthielt. Die Struktur eines Strophanthidin-3-β-O-[4-β-D-allopyranosyl-β-6-desoxy-D-allopyranosids](Strophanthidinalloallomethylosid) konnte durch ^{13}C-NMR-Experimente gesichert werden.

Glykosid D 2 war mit dem zum Strukturbeweis synthetisierten Strophanthidin-3-β-O-β-6-desoxy-D-glucopyranosid (Strophanthidinchinovosid) identisch.

Glykosid F leitete sich vom k-Strophanthidin ab und wurde als Strophanthidin-3-β-O-[3-β-D-glucopyranosyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid] identifiziert.

Die Antiarigeninglykoside D 3 und G 2 enthielten die gleichen Zucker wie die Strophanthidinglykoside D 1 und E. Das Monosid D 3 war identisch mit dem bisher nur einmal isolierten Antiari-

genin-3-β-O-β-6-desoxy-D-allopyranosid (Antiallosid). Das Diglykosid G 2 wurde als Antiarigenin-3-β-O-[4-β-D-allopyranosyl-β-6-desoxy-D-allopyranosid](Antiarigeninalloallomethylosid) identifiziert.

In Glykosid G 1 wurde zum ersten Mal die Hexose D-Gulose aufgefunden. Für G 1 konnte die Struktur eines Antiarigenin-3-β-O-[3-β-D-gulopyranosyl-β-6-desoxy-D-talopyranosids] (Antiarigenin-gulotalomethylosid) ermittelt werden.

Zusätzlich konnten k-Strophanthidin, Antiarigenin sowie β-Antiarin (Antiarigeninrhamnosid) durch DC- und HPLC-Vergleich identifiziert werden.

Damit konnte etwa die Hälfte der in der Stammrinde enthaltenen Glykoside und Aglykone isoliert und aufgeklärt werden.

Die positiv inotrope Wirkung der isolierten Glykoside, getestet am Meerschweinchenpapillarmuskel in einer Versuchungsanordnung nach REITER, lag im Bereich von Convallatoxin und k-Strophanthosid. Neben den bekannten cytotoxischen Aktivitäten der Herzglykoside und Herzglykosidfraktionen konnte ein zweites cytotoxisches Prinzip in einer cardenolidfreien Fraktion des Trennungsganges gefunden werden.

Für die Lophopetalum-Cardenolide wurde eine HPLC-Trennmethode entwickelt, die sich auch zur Isolierung im semipräparativen Maßstab eignet. Für die Identifizierung aller acht diastereoisomeren 6-Desoxyhexosen und Hexosen wurden ein Trennverfahren am Zuckeranalysator für den Mikromaßstab ausgearbeitet.

Der chromatographische und pharmakologische Vergleich zwischen einem Extrakt von Lophopetalum toxicum und der vorwiegend in Indien vorkommenden Lophopetalum wightianum ARN. ergab große Ähnlichkeit im Inhaltsstoffmuster. Gefunden wurden in Lophopetalum wightianum in hoher Konzentration k-Strophanthidin und Strophanthidinchinovosid neben Strophallosid und Antiallosid. Dagegen fehlten in dieser Art die aus Lophopetalum toxicum isolierten Diglykoside. Keine KEDDE-positiven Substanzen konnten in den Blättern und in der Rinde einer dritten Art, in Lophopetalum arnhemicum N.BYRNES, festgestellt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Herkunft der Drogen

a) Die Stammrinde von Lophopetalum toxicum wurde im August 1976 im tropischen Bergwald im Süden der Philippinen gesammelt und an der Luft mehrere Wochen getrocknet. Im Mai 1977 traf sie in München ein, übersandt von Frau Prof.Dr.Oliveros-Belardo [+]. Die Droge ist identisch mit dem Muster Lophopetalum toxicum (Bl. 1), von dem uns im August 1980 1 kg von Dr.Zara [++] zur Verfügung gestellt wurde. Herkunftsort ist die philippinische Provinz LAGUNA.

b) Durch Frau Shah [+++] konnten wir im Juli 1980 4 kg der gepulverten Stammrinde von Lophopetalum wightianum (Bl. 2), gesammelt im Süden Indiens, erhalten.

c) Die australische Art Lophopetalum arnhemicum wurde im Juni 1977 von Frau Dr.Bladt [++++] in der Gegend des ALLIGATOR RIVER, Nordaustralien, gesammelt (Bl. 3).

2. Allgemeine Arbeitsmethoden

2.1. Dünnschichtchromatographie

2.1.1. Adsorbentien

für die analytische DC

Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.25 mm, Fa. Merck (Art.Nr. 5715)

DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm, Fa. Merck (Art.Nr. 5554)

DC-Alufolien Cellulose 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.1 mm, Fa.Merck (Art.Nr. 5552)

Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC) 10 x 20 cm, Fa. Merck (Art.Nr. 5642)

+) Frau Prof.Dr.Luz Oliveros-Belardo, Director of The Philippine Women's University, Natural Science Center, Manila,Philippines

++) Frau Dr.Pacita Zara, National Science Dev.Board, Bicutan, Taguig, Metro Manila, Philippines

+++) Frau Virbala Shah, Hoechst Pharmaceuticals Ltd., Research Center, Lal Bahadur Shastsi Marg., Mulund, Bombay, India

++++) Frau Dr.Sabine Bladt, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

für die präparative DC

Kieselgel 60 F_{254} Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.5 cm, Fa. Merck (Art.Nr. 5744)

Kieselgel 60 HF_{254} für die DC, Glasplatten 20 x 20 cm selbstgestrichen, Fa. Merck (Art.Nr. 7739)

Auftragetechnik

Bandförmiges Auftrages mit ausgezogenem Kapillarröhrchen oder DESAGA-Autoliner nach STAHL.

2.1.2. Laufmittelsysteme

Herzglykoside: Dichlormethan-Methanol (95:5 und 9:1)
Äthylacetat-Methanol (95:5 und 9:1)
Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10)
Chloroform-Äthanol-Methanol-Wasser (7:3:2:1)
Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:13.4:10) (BITTNER 86))
Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)
Äthylacetat-Pyridin-Wasser (5:1:4) (Oberphase)

Zucker: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)
Isopropanol-Pyridin-Wasser (6:2:2) (für Cellulose)
Aceton-Chloroform-Methanol-Wasser (10:2:4:1) (noch verbesserte Auftrennung durch Imprägnierung mit 0,3 M-Dinatriummonohydrogenphosphatlösung) 44)

Alkaloide: Diisopropyläther-Dichlormethan-Äthylacetat-Äthanol (50:30:15:1)
Toluol-Äthylacetat-Methanol (6:4:1)

Flavonoide: Äthylacetat-Ameisensäure-Essigsäure-Wasser (100:17.5:6:30)

2.1.3. Detektion

Herzglykoside: a) auf Kieselgel F_{254} Löschung im UV_{254}-Licht

b) Farbreaktion nach Besprühen mit

KEDDE-Reagenz +) 9) (1 Teil einer Lösung von 3 g 3,5-Dinitrobenzoesäure in 100 ml Äthanol und 1 Teil 2 N-Kalilauge werden jeweils frisch gemischt)

RAYMOND-Reagenz +) 24,25) (1 Teil einer Lösung von 2 g m-Dinitrobenzol in 100 ml Äthanol und 1 Teil 2,5 N-methanolische Kalilauge werden jeweils frisch gemischt)

+) Farbreaktion nur mit Cardenoliden

BALJET-Reagenz +) [26] (1 Teil einer Lösung von 3.6 g 2,4,6-Trinitrophenol in 100 ml Äthanol und 1 Teil 1%ige- Natronlauge werden jeweils frisch gemischt)

c) Farbreaktion und/oder Fluoreszenz im UV_{366} sofort nach Besprühen und/oder nach ca. 10 Min. im Trockenschrank bei 120°

konzentrierte Schwefelsäure

85%ige Schwefelsäure

Vanillin/Schwefelsäure [27] (1 g/100 ml)

Komarovsky-Reagenz 127) (1 Teil einer Lösung von 2 g 4-Hydroxybenzaldehyd in 100 ml Methanol und 1 Teil 5%ige Schwefelsäure werden gemischt)

JENSEN/KAISER-Reagenz [28,48] (1 Teil einer 3%igen wässrigen Chloraminlösung und 15 Teile einer 25%igen äthanolischen Trichloressigsäurelösung werden jeweils frisch gemischt)

Antimontrichlorid/Chloroform [29] (20 g/100 ml) (CARR-PRICE-Reagenz)

Zucker: Farbreaktionen nach ca. 10 Min. im Trockenschrank bei 120°

Anilin/Diphenylamin/85%ige Phosphorsäure/Methanol (2 ml/2 g/10 ml/ad 100 ml)

Anilin/Phthalsäure/n-Butanol (wassergesättigt) (1 ml/1.7 g/ad 100 ml) (für Cellulose)

Xanthydrol-Reagenz [30,31] (0.1%ige Lösung von Xanthydrol in 90 ml Äthanol und 10 ml konz.Salzsäure)

konzentrierte Schwefelsäure

Alkaloide: Modifiziertes DRAGENDORFF-Reagenz nach RUBIA und GOMEZ 10):
Auf den detektierten Platten verbleiben nach Sublimation der Joddämpfe orange Flecken auf weißem Grund. (100 ml einer 1.7%igen wässrigen Wismutnitratlösung und 100 ml einer 40%igen wässrigen Kaliumjodidlösung werden gemischt und mit 10%iger Schwefelsäure auf 1 l aufgefüllt. Man fügt 6 g fein gepulverte Jodkristalle zu. Nach 30minütigem Schütteln wird filtriert).

Flavonoide: Fluoreszenz im UV_{366} nach ca. 10 Min. bei 110°

Naturstoffreagenz (1% in Methanol), Nachbesprühen mit PÄG 4000 (10% in Methanol) mod. nach 129)

+) Farbreaktion nur mit Cardenoliden

2.2. Säulenchromatographie

2.2.1. Sorbentien

Kieselgel 60 HF_{254} (für die DC) Fa. Merck (Art.Nr. 7739)
(Besonderheit der Kieselgelsäulen: Hoher Laufmitteldruck durch überlange Säulen bei niedriger Füllhöhe des Sorbens)

Polyamid
(hergestellt aus Ultramid B3 der Fa. BASF nach einem Institutsverfahren. Monomere Anteile wurden durch jeweils 3maliges Rühren mit Wasser und Methanol entfernt [87])

2.2.2. Laufmittel

für Kieselgel: Äthylacetat-Methanol (95:5 und 9:1)
Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10)

für Polyamid: Wasser

2.3. Droplet Counter-Current Chromatographie (DCCC, präparativ)

Gerät:	DCC-A (Tokyo Rikakakai, Tokyo, Japan)
Säulen:	300 Glassäulen, je 40 cm x 2.0 mm Innendurchmesser
Durchflußrate:	20 ml/h
mittlerer Druck:	10 kp/cm^2
Temperatur:	20^o
Probeneingabe:	gelöst in einer 1:1-Mischung von mobiler und stationärer Phase und filtriert
Detektion:	DC-Identifizierung der Fraktionen auf Kieselgelplatten mit KEDDE-Reagenz und konz.Schwefelsäure
Füllmenge je Reagenzglas:	10 ml bei a) 4 ml bei b)

a) Laufmittelsystem für die Trennung der Glykoside E und F:

Chloroform-Methanol-n-Propanol-Wasser (5:6:1:4)

zur Isolierung von E: mobile Phase = obere Schicht
stationäre Phase = untere Schicht
(= aufsteigende Methode)

zur Isolierung von F: mobile Phase = untere Schicht
stationäre Phase = obere Schicht
(= absteigende Methode)

b) Laufmittelsystem für die Trennung der Glykoside G 1 und G 2:

Chloroform-Methanol-n-Propanol-Wasser (45:70:5:40)

zur Isolierung von G 1: mobile Phase = obere Schicht
stationäre Phase = untere Schicht
(= aufsteigende Methode)

zur Isolierung von G 2: mobile Phase = untere Schicht
stationäre Phase = obere Schicht
(= absteigende Methode)

2.4. HPLC

a) apparative Daten:

Pumpe:	M 6000 A (WATERS ASSOC.)
Einspritzsystem:	U 6 K (WATERS ASSOC.)
Detektor:	Spektralphotometer LC 75 (PERKIN ELMER)
Säule:	µ-Bondapak- C 18 (300 x 4 mm ID, Stahl)
Printer/Plotter:	WATERS ASSOC.

b) Trennparameter:

Eluens:	Acetonitril-Wasser (20:80 und 10:90)
Durchfluß:	2 ml/Min.
Detektion:	Spektralphotometer bei 220 nm

2.5. Zuckeranalysator

Die Trennung der 6-Desoxyhexosen und Hexosen erfolgte in einem Zuckeranalysator (ZA 5100, Biotronik) mit einem Einpuffersystem. Das Hydrolysat bzw. das Zuckergemisch wurde dabei in einem Pufferstrom (Borat-Puffer) mit ca. 30 bar über einen stark basischen Ionenaustauscher (DA-X4-20, Durrum) gepumpt. Nach Elution aus der Säule wurden die getrennten Zucker in einem 20 m langen Teflonschlauch, der sich in einem Reaktionsbad mit siedendem Wasser befand, mit dem Farbreagenz versetzt. Die Detektion der sich bildenden Farbkomplexe erfolgte anschließend in einem Durchflußphotometer bei 420 nm. Die Photometersignale wurden als Extinktionswerte linear auf dem Schreiber registriert bzw. direkt von einem Integrator ausgewertet.
Die Trenndauer betrug bei der isogradischen Trennung für das getrennte Gemisch 2 1/4 Stdn. Die Einspritzvolumina lagen zwischen 5 - 250 µl. (Die Nachweisgrenze liegt unter 1 µg Einzelzucker).

Säule:	0.6 x 27 cm
Säulentemperatur:	58°C
Harz:	DA-X4-20
Boratpuffer:	pH 9.1/0.3 M
Farbreagenz:	Orcin/Schwefelsäure, 0.1%ig
Pufferdurchfluß:	60 ml/h

2.6. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte

Die Substanzen werden in der Trockenpistole über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Schmelzpunkte bestimmten wir auf der Kofler-Heizbank der Fa.Reichert, Wien. Die angegebenen Schmelzintervalle sind unkorrigiert.

Optische Drehung

Die Messung erfolgte im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss (LEP A 2). Die Substanzen wurden in Methanol/UVASOL der Fa. Merck (Art.Nr. 6002) gelöst.

UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden in äthanolischer Lösung (Äthanol p.A.) mit dem UV-Spektrometer DB-G der Fa. Beckman aufgenommen.

IR-Spektren

Die Substanzen wurden in Kaliumbromid gepreßt mit einem Acculab-1 Spektrophotometer der Fa. Beckman gemessen.

FD-Massenspektren

Die elektrisch registrierten Felddesorptionsmassenspektren wurden am Institut für Physikalische Chemie der Universität Bonn mit einem doppelt fokussierenden Varian MAT 731 Massenspektrometer und einem Varian Spektro-System 200 Datensystem aufgenommen. Bei allen Untersuchungen wurden hochtemperaturaktivierte 10 µm Wolframdraht-Emitter mit 40 µm Nadellänge der Kohlenstoffdendriten verwendet, die mehrmals in die in wenig Methanol gelösten Proben eingetaucht und getrocknet wurden. Der Emitter befand sich auf einem Potential von +8 kV, die Gegenelektrode auf -3 kV. Die Temperatur der Ionenquelle betrug bei allen Messungen

ca. 40°C. Der Quellendruck war 10^{-6} Torr, das Auflösungsvermögen (bei 10% Taldefinition) betrug etwa 2000. Bei einer Scangeschwindigkeit von ca. 100 mμ/sec wurden jeweils 8 Spektren gemittelt.

^{1}H-NMR-Spektren

Die Aufnahmen der Kernresonanzspektren erfolgten an unserem Institut mit einem Bruker WP-80 Kernresonanzspektrophotometer und einem Varian A-60 Kernresonanzspektrophotometer.

^{13}C-NMR-Spektren

Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden an unserem Institut auf einem Bruker WP-80 Kernresonanzspektrophotometer bei 20.15 MHz und 353°K aufgenommen.

2.7. Pharmakologische Untersuchungen

2.7.1. Test auf positiv inotrope Wirkung

Das von Prof.Reiter benutzte Testmodell benutzt Papillarmuskeln von Meerschweinchen [14]. Dem Tier wird unmittelbar nach der Tötung das sich noch kontrahierende Herz entnommen. Aus dem rechten Ventrikel präpariert man die Papillarmuskeln, die schwächer, weniger verwachsen und besser ansprechend sind als die aus dem linken Ventrikel. Je 1 Muskel wird zwischen Reizelektrode und isometrischen Hebel eingespannt, in ein mit 50 ml Krebs-Henseleit-Lösung (Na^{+}-, K^{+}-, Ca^{++}-Ionen) auf 37° temperiertes Organbad versenkt und von einem Gemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 umspült. Der Muskel wird leicht gedehnt und mit einer Reizspannung zur Kontraktion gezwungen. Nach etwa 45 Min. hat die Kontraktionskraft bei gleichbleibender Reizfrequenz einen konstanten Wert erreicht. Die Apparatur ist an Monitor und Schreiber gekoppelt. Die gelösten Substanzen werden in möglichst kleinen, aber sicher abzumessenden Volumina dem Organbad zugegeben. Nach ca. 15 - 20 Min. ist jeweils die veränderte Kontraktionskraft konstant, worauf die doppelte Dosis der Substanzen zugesetzt wird. Dies geschieht sooft, bis die Kontraktionskraft nicht mehr zu, sondern abnimmt. Die auf der Lichtanzeige jeweils sichtbaren

konstanten isometrischen Spannungskurven (Ordinate: Kraft in p, Abszisse: Zeit in 1/10 sec) werden mit einer Sofortbildkamera übereinander photographiert.

Auswertung:
Angegeben werden die mg Extrakt bzw. Mol Substanz, die am Muskel maximale Kontraktion (= Kraft in p) bzw. halbmaximale Kontraktion (EC_{50}) hervorruft. Dazu werden graphisch Dosis-Wirkungskurven erstellt (Ordinate: Kontraktionskraft in %, maximale = 100%, Abszisse: Dosis in mg oder Mol). Die EC_{50}-Werte können als Stoffkonstanten angesehen werden, während der Kurvenverlauf der Spannungskurven (symmetrisch, asymmetrisch, Schnelligkeit des Amplitudenanstiegs, usw.) Aussagen über Reaktionsmechanismus bzw. chemische Struktur der Probe erlaubt. Eine Einschränkung betrifft jedoch die Reproduzierbarkeit auf Grund der verschiedenen Muskeln, wobei EC_{50}-Werte der gleichen Probe bei verschiedenen Muskeln weniger differieren als die der maximalen Kontraktion entsprechenden Werte.

2.7.2. Test auf Cytotoxizität

2.7.2.1. Screening auf Antitumorwirksamkeit am National Cancer Institut, Bethesda, Maryland, USA

Auf unsere Anfrage teilte das NCI ohne nähere Angaben mit, daß LOPHOPETALUM toxicum bereits mit positivem Ergebnis getestet sei, die Arbeiten jedoch infolge "Instabilität" der Wirkstoffe abgebrochen werden mußten. Da bereits einmal der Testung unterzogene Pflanzenextrakte kein zweites Mal untersucht werden, ließen wir je 1 nach der Vorschrift des NCI hergestellte Äthanol- und Chloroformfraktion +) unter dem Synonym SOLENOSPERMUM toxicum testen. Die Tests wurden unter den NCI-Codenummern B 83 85 77 und B 83 85 78 zwischen dem 8.August 1977 und 22. Dezember 1978 durchgeführt.

2 Tumorsysteme wurden herangezogen: Für in vitro-Untersuchungen Zellkulturen des KB-Systems, das aus humanem Nasopharynx-Epidermiscarcinom in Eagle's Basalmedium kultiviert

+) Dazu wurden 300 g Pulverdroge mit Petroläther entfettet und durch Soxhletextraktion des getrockneten Materials mit 96%igem Äthanol p.A. ein Äthanolextrakt gewonnen. Aus der Verteilung von 2/3 des Extraktes gegen Chloroform-Wasser (1:1) erhielten wir den Chloroformextrakt.

wurde, und für in vivo-Untersuchungen das P 388-System an weiblichen und männlichen Mäusen mit Lymphozyten-Leukämie.

In vitro wird die Wachstumshemmung nach 3 Tagen im Vergleich mit einem Kontrollversuch festgestellt und die Ergebnisse als Dosis ausgedrückt, die 50%ige Wachstumshemmung hervorruft (ED_{50}).
In vivo erfolgte die Testung an je 6 weiblichen und männlichen Mäusen, denen verschiedene Konzentrationen von Extraktmaterial an 3 aufeinanderfolgenden Tagen täglich injiziert wurden, im Vergleich mit einer Kontrollgruppe.

2.7.2.2. Hemmung der ^{3}H-Thymidin-Einbauraten in Asciteszellen

Das Maß der Hemmung der DNA-Synthese von Tumorzellen durch Pflanzenextrakte oder Reinsubstanzen kann zahlenmäßig erfaßt werden durch die veränderten Einbauraten von ^{3}H-Thymidin in Asciteszellen von Walker-250-Carcinosarkomen von Ratten.
Die Methodik des Verfahrens stammt von WEITZEL und SCHNEIDER [79]. Danach werden 3 ml Zellsuspension von Walker-250-Carcinosarkom-Ascites in einem 50 ml Zentrifugenglas mit 10 ml MEDIUM L-15 (Zellkultur Boehringer, Mannheim Art.Nr.209 848) versetzt und 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Zentrifugenglas bis 1 cm unter dem Rand mit Medium aufgefüllt. Aus der gerührten Zellsuspension gibt man je Probe 1 ml (entsprechend 2.067×10^{6} Zellen/ml) in ein Glasschliffzentrifugenglas und fügt 500 µl Extrakt-Substanzlösung bzw. -suspension (2 - 10 mg in physiologischer NaCl-Lösung mit Ultraschall suspendiert) entsprechend 2 mg/ml hinzu. Statt Hemmstofflösung wird in einem parallel durchgeführten Kontrollversuch 500 µl Medium zugegeben. Außerdem wird jeder Versuch je nach Ausgangsmenge 4 - 6mal durchgeführt. Die Proben werden 2 Stdn. bei 37° vorinkubiert. Anschließend wird je Probe 100 µl ^{3}H-Thymidin (spez. Akt. 50.8 Ci/mMol), entsprechend 1 µCi, zugegeben und eine weitere Stunde unter Schütteln inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird der Einbau gestoppt, jede Probe mit 1.5 ml

1N-Perchlorsäure versetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Niederschläge, die die eingebauten Präkursoren enthalten, werden dann durch Filterpapier (Ø 2.5 cm), das mit Perchlorsäure befeuchtet ist, abgesaugt und mit 5%iger Trichloressigsäure und schließlich mit Äthanol gewaschen. Die Filter werden in Polyäthylenfläschchen gebracht und die Aktivitäten im Toluol-Scintillator gemessen. Die Ergebnisse werden mit der Kontrolle verglichen und die Hemmeffekte in % ausgedrückt.

3. Spezielle Arbeitsmethoden

3.1. Voruntersuchung von Lophopetalum toxicum

Extraktion:

100.0 g fein gepulverte Droge wurden mit 300 ml Toluol am Soxhlet extrahiert. Aus dem Drogenpulver erhielten wir durch Perkolation mit 700 ml 96%igem Äthanol und 600 ml Wasser zwei Fraktionen. Das äthanolische Perkolat wurde mit 1 l Wasser versetzt und der Äthanolanteil weitgehend abdestilliert. Aus der fünfmaligen Verteilung gegen Äthylacetat resultierten eine Äthylacetatfraktion und eine Wasserfraktion, aus der die Gerbstoffe durch Bleiacetatfällung entfernt wurden.

Bleiacetatfällung:

Die Wasserfraktion wurde bis zur vollständigen Fällung mit 10%iger wässriger Bleiacetatlösung versetzt. Die Lösung wurde abfiltriert, der Niederschlag mit 70%igem Äthanol gewaschen. Waschflüssigkeiten und Überstand wurden auf 300 ml eingeengt und mit 10%iger wässriger Ammoniumsulfatlösung überschüssiges Blei entfernt. Filtrat und Waschflüssigkeiten ergaben nach Eindampfen Perkolat I.

Polyamidfiltration:

Der wässrige Drogenextrakt wurde mit 100 g frisch mit Wasser gewaschenem Polyamidpulver vermischt. Die Filtration der Suspension erfolgte durch eine Lage frischen Polyamids. Filtrat und Waschflüssigkeiten ergaben nach Eindampfen Perkolat II.

3.2. Isolierung der Glykoside

Extraktion:

854 g gepulverte Stammrinde wurden in zwei Soxhletapparaturen mit 3 l Toluol während zweier Tage extrahiert. Die extrahierten Pulver wurden zusammen unter dem Abzug ausgebreitet und nach 5 Tagen eine Nacht lang mit 300 ml 70%igem Äthanol angefeuchtet. Nach sorgfältigem Beschicken des Perkolators ließen wir die Droge tropfenweise über 5 Tage hinweg mit 8 l 70%igem Äthanol extrahieren, bis im Eluat keine KEDDE-positiven Substanzen mehr nachweisbar waren. Der rotbraune Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trübung auf etwa 1.5 l eingeengt.

Gerbstoffällung:

Zu dem Perkolat gab man eine 10%ige wässrige Bleiacetatlösung. Es setzte sich eine dunkelbraune Fällung ab. Der gelbliche Überstand wurde durch Zugabe weiterer Bleiacetatlösung auf Vollständigkeit der Fällung überprüft und anschließend dekantiert. Die Fällung wurde durch eine Porzellannutsche (Ø ca. 30 cm) oftmals mit 70%igem Äthanol und Wasser gewaschen, die Waschflüssigkeit mit dem dekantierten Überstand vereinigt und erneut am Rotationsverdampfer auf etwa 1.5 l eingeengt. Aus dieser Lösung erfolgte mit 10%iger wässriger Ammoniumsulfatlösung die Ausfällung überschüssigen Bleis. Der gelbe Überstand wurde dann dekantiert, die weiße Fällung abgenutscht und mit Wasser und 70%igem Äthanol oftmals ausgewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde mit dem dekantierten Überstand vereinigt und auf 1.5 l eingeengt, um den Alkohol möglichst weitgehend zu entfernen.

Verteilungen:

Die Verteilungsschritte wurden mindestens je 6mal durchgeführt. Die erste Verteilung erfolgte zwischen Diäthyläther und Wasser. Dazu wurde die wässrige Extraktlösung mit 1 l Diäthyläther versetzt und die Oberphase eingedampft, der Äther wiedergewonnen und erneut zur Ausschüttelung verwendet. Die gesammelten Ätherlösungen bildeten 0.5 g Phase "A", die wiederum gegen Wasser verteilt 0.4 g Ätherphase "A 1" und 0.06 g Wasserphase "A 2"

ergaben. "A 2" wurde zur wässrigen Extraklösung gegeben und die Ausschüttelung in gleicher Weise mit Chloroform durchgeführt, wobei 0.26 g der Chloroformphase "B" resultierten. Eine weitere Verteilung der wässrigen Extraktlösung gegen 3 l eines Chloroform-Äthanol (9:1)-Gemisches ergab 0.2 g Phase "C", die der jetzt wässrig-äthanolischen Extraktlösung gegen ein Chloroform-Äthanol (4:1)-Gemisch führte zu 0.15 g Phase "D". Es schlossen sich Verteilungen gegen ein Chloroform-Äthanol (2:1)-Gemisch (1.9 g Phase "E") und ein Chloroform-Äthanol (3:2)-Gemisch (6.5 g Phase "F") an. Die restliche Extraktlösung "G" war frei von KEDDE-positiven Substanzen.

Isolierung der Glykoside D 1 und D 2:

Die Phase "C" und "D" wurden jeweils in wenig Äthanol gelöst auf Säulen mit einem Innendurchmesser von 2.5 cm und einer Höhe von 2 m gegeben, deren nur 20 cm hohe Füllung aus Kieselgel 60 für die Dünnschichtchromatographie bestand. Die Elution erfolgte mit dem System Äthylacetat-Methanol (95:5). Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 15 Tropfen/Min. und einer Glasfüllung von 5 ml konnten Anreicherungen von D 1 in den Fraktionen 15 - 37 und von D 2 in den Fraktionen 51 - 72 erhalten werden. Die Gläser 38 - 50 bestanden aus einem einheitlichen Gemisch von beiden. Anschließend wurden die vorfraktionierten Anteile durch präparative Dünnschichtchromatographie im Laufmittelsystem BITTNER weiter aufgetrennt und die mit Chloroform-Äthanol (2:1,p.A.) extrahierten und durch eine G 4-Fritte weitgehend vom Kieselgel befreiten Substanzen über kurze Polyamidsäulen (Ø 0.5 cm, Höhe 30 cm, Füllhöhe des Polyamids 20 cm, Höhe der Wassersäule über dem Polyamid 1.5 m), die vorher mit Wasser gespült und deren Füllung unter Druck verfestigt worden war, mit Wasser gereinigt. Aus den Eluaten konnten nach Filtration durch Membranfilter und anschließende Gefriertrocknung die Reinglykoside D 1 und D 2 erhalten werden.

Isolierung der Glykoside D 3, E und F:

Phase "E" wurde auf 6 Säulen wie oben beschrieben aufgeteilt und nacheinander in den Systemen Äthylacetat-Methanol (9:1) und Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) vorgereinigt.

Bei einem 30minütigen Reagenzglaswechsel wurden jeweils 12 ml aufgefangen. Die Fraktionen 18 - 21 enthielten D 3, E war stark angereichert in 33 - 45 und F in 48 - 63. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wieder mittels präparativer DC. D 3 wurde im Laufmittelsystem VI abgetrennt und mit Chloroform-Äthanol (3:2, p.A.) aus dem Kieselgel eluiert. Die Reindarstellung vollzog sich wie bereits oben dargestellt. E und F wurden im Laufmittelsystem Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) chromatographiert (DC) und mit Methanol p.A. aus dem Kieselgel eluiert. Wieder schloß sich die Reinigung mit Hilfe von Polyamid an.

Isolierung der Glykoside E, F, G 1 und G 2:

Phase "F" wurde in heißem Äthanol gelöst und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Vom bräunlich-weißen Niederschlag wurde abzentrifugiert und die Lösung weitere 3 Tage in der Kälte belassen. Es erfolgte eine weitere Ausfällung. Die weiße Substanz erwies sich nach Trocknung als identisch mit DULCIT (Smp., IR). Die Lösung wurde fast zur Trockne eingeengt und über 5 Kieselgelsäulen (Ø 3.5 cm), beschickt mit Kieselgel 60 für die DC, im System Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) vorgetrennt. Die aus 5 ml bestehenden Fraktionen waren folgendermaßen zusammengesetzt:

Fraktionen:	Zusammensetzung:
60 - 67	D 6 und E
68 - 70	vorwiegend E
71 - 95	E und F
96 - 103	vorwiegend F
104 - 130	F und G 1
131 - 136	vorwiegend G 1
137 - 179	G 1 und G 2
180 - 183	vorwiegend G 2
184 - 232	G 2 und H 1

Aus den bereits vorwiegend die Reinglykoside enthaltenden Fraktionen konntendurch Behandlung wie vorher gezeigt kleine Mengen isoliert werden. Die übrigen Fraktionen wurden zusammengeschüttet, eingedampft, mit Wasser über Polyamidsäulen gereinigt und

zu zwei Sammelfraktionen vereinigt, welche in hoher Anreicherung E und F bzw. G 1 und G 2 enthielten. Aus diesen erfolgte die Isolierung durch Anwendung der DCCC-Methode.

DCCC-Trennung der Glykoside E und F:

Die lipophile Phase des Systems Chloroform-Methanol-n-Propanol-Wasser (5:6:1:4) hatte auf der Kieselgel-DC-Platte eine Trennung von E und F ermöglicht. Aus durch Destillation weiter gereinigter p.A.-Ware wurden deshalb 4 l des Gemisches hergestellt und über Nacht zur Phasentrennung auf 20° temperiert. Für die Isolierung von E wurde die Unterphase ca. 6 Stdn. lang in die Säulen eingepumpt. 260 mg Sammelfraktion, gelöst in gleichen Teilen von Ober- und Unterphase und filtriert, wurden nach der aufsteigenden Methode mit der Oberphase als mobiler Phase durch das System gepumpt. Aus dieser ersten Trennung sammelten wir 60 mg von E und 17 mg F. Mit der umgekehrten Anordnung, d.h. vertauschter mobiler bzw. stationärer Phase (absteigende Methode) konnten wir aus dem Rückstand der E-Trennung 52 mg F und weitere 24 mg E gewinnen. Die Glykoside wurden eingedampft, in Wasser aufgenommen und wie oben gezeigt über Polyamidsäulen mit Wasser gereinigt.

DCCC-Trennung der Glykoside G 1 und G 2:

Wie oben wurde das 2-Phasen-System Chloroform-Methanol-n-Propanol-Wasser (45:70:5:40) vorbereitet. Durch aufsteigende Trennung und nachfolgende Polyamidreinigung erhielten wir 35.3 mg G 1. Nach dem Einrotieren der gesamten verwendeten Lösungsmittel des Systems unterwarfen wir den Rückstand erneut der Trennung im gleichen Laufmittelgemisch, jedoch absteigend. Die Fraktionen 283 - 330 wurden gesammelt und wie oben gereinigt. Nach Gefriertrocknung ergab sich eine Ausbeute von 27.5 mg G 2.

3.3. Hydrolysen

3.3.1. Trifluoressigsäure-Hydrolyse

1 mg Glykosid wurde in 3 ml 2N-Trifluoressigsäure [94] gelöst und 1 Stde. unter Rückfluß auf dem Dampfbad erhitzt. Die bräunlich verfärbte Lösung wurde am Rotationsverdampfer mehr-

mals unter Zugabe von jeweils 4 ml Methanol p.A. zur Entfernung der Trifluoressigsäure eingeengt und dann eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung mit Diisopropyläther p.A. ausgeschüttelt. Beide Phasen wurden eingedampft und zur Analytik der Zucker sowie dem Vergleich der Monoglykoside, Aglykone und Spaltprodukte mit bekannten Substanzen benutzt.

3.3.2. Mikrohydrolyse auf der DC-Platte [37)]

Von einer DC-Fertigplatte mit Kieselgelbeschichtung wurde jeweils vom Rand her Kieselgel in einer Breite von 5 mm abgeschabt. Die zu hydrolysierenden Glykoside wurden in methanolischer Lösung 2 cm vom unteren Rand der Platte bandförmig in einer Breite von 1 cm und einer Höhe von 1 mm aufgetragen. Ebenso wurden Vergleichszucker und -glykoside aufgetragen. Die Platte wurde in eine 30 Min. bei 100° im Trockenschrank aufgeheizte, mit konzentrierter Salzsäure 1 cm hoch gefüllte Glaskammer gegeben, deren Boden innen so erhöht war, daß die Platte nicht mit der Salzsäure in Berührung kam. Nach weiteren 30 Min. bei 100° waren die Auftragszonen braun verfärbt; die Platte wurde aus der HCl-Atmosphäre herausgenommen und unter dem Abzug 2 Stdn. lang abgeföhnt. Schließlich wurde sie im Laufmittel Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) chromatographiert. Der R_f-Bereich bis 0.7 wurde zum Zuckernachweis benutzt, der darüberliegende zur Sichtbarmachung der Cardenolid-Spaltprodukte herangezogen.

3.3.3. Enzym-Hydrolyse

Weinbergschnecken wurden wie bei HUBER et al. [99)] beschrieben behandelt und aus ihnen der Darminhalt mit den darin enthaltenen Enzymen gewonnen. 20 mg einer die Diglykoside enthaltenden Fraktion wurden in 10 ml Wasser gelöst (pH 5). 2 ml Darminhalt wurden hinzugefügt und das Zentrifugenglas in ein Ölbad gegeben, in dem es 2 Tage bei 42° thermostatisiert wurde. Während dieser Zeit wurde der Verlauf der Hydrolyse chromatographisch verfolgt. Ein zweiter Versuch erstreckte sich über 8 Tage.

In ähnlicher Weise wurde mit α-Glucosidase (Maltase) aus Hefe (Fa.Serva, Art.Nr. 22828) und β-Glucosidase (Emulsin) aus Süßmandeln (Fa.Serva, Art.Nr. 22830) verfahren. Die Bedingungen für die Anwendung der α-Glucosidase waren pH 6.0 und 35°C über 8 Tage, die Reaktion mit β-Glucosidase führte bereits nach 2 Tagen bei pH 5.0 (0.1 M-Acetatpufferlösung) und 35° zur Hydrolyse.
In allen Fällen versetzte man dann mit 10 ml heißem Äthanol und zentrifugierte. Der Rückstand wurde mehrmals mit Äthanol aufgenommen und die Suspension erneut zentrifugiert. Die gesammelten Zentrifugate wurden am Rotationsverdampfer eingeengt.

3.4. Synthese des Strophanthidinchinovosids

1) Reinigung von Zeolith
2) Herstellung von Fetizon-Reagenz [47] (=Silbercarbonat-Zeolith-Reagenz)
3) Modifizierte Koenigs-Knorr-Synthese [46]
4) Hydrolyse und Isolierung

zu 1): 5.0 g Kieselgur wurden mehrmals mit einer 10%igen Lösung von Salzsäure in Methanol gereinigt und abgenutscht und darauffolgend mit Wasser gewaschen, bis die Waschflüssigkeit keine Reaktion mehr auf Cl^-- Ionen gab und neutral war. Das so gereinigte Kieselgur wurde bei 120° im Trockenschrank getrocknet.

zu 2): 3.4 g Silbernitrat wurden in einem mit Schwarzpapier verdunkelten Glaskolben in 20.0 ml Wasser gelöst; in diese Lösung gab man unter Rühren am Magnetrührer 3.0 g gereinigtes Zeolith. Die Suspension wurde 10 Min. lang gerührt und dann mit einer Lösung von 3.0 g Natriumcarbonat ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$) in 30.0 ml Wasser versetzt. Es entstand eine gelbliche Fällung, die weitere 10 Min. in der Suspension gerührt wurde. Der Niederschlag wurde abgenutscht und oftmals mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Er wurde anschließend im Trockenschrank auf einer Tonschale ausgebreitet unter Lichtschutz bei 50° getrocknet.

zu 3): 570 mg frisch zubereitetes Fetizon-Reagens und 100 mg k-Strophanthidin wurden in einem 50 ml Glaskolben mit 15 ml Dichloräthan versetzt. 5 ml wurden auf dem Ölbad unter Rühren abdestilliert, um Wasserspuren zu entfernen. Zu der auf 120° erhitzten Suspension wurde 0.3 g Acetobromchinovose in 15 ml Dichloräthan auf einmal zugegeben und wieder 5 ml abdestilliert. Der Aufbau wurde mit einem Kühler vervollständigt und der Inhalt des Kolbens 30 Min. lang unter Rühren weiter erhitzt. Die Apparatur war durch Umhüllung mit Alufolie vor Licht geschützt. Der Kolbeninhalt wurde abfiltriert und das Filtrat eingedampft. Aus Äthanol konnten Kristalle von k-Strophanthidin-β-6-desoxy-D-glucopyranosid-triacetat (Smp. 266 - 267°) in 62%iger Ausbeute gewonnen werden.

zu 4): Ammoniakgas wurde bei 0° bis zur Sättigung in Methanol eingeleitet und das Strophanthidinchinovosidtriacetat in dieser Lösung zur Hydrolyse angesetzt. Nach 3 Tagen bei 0° war die Hydrolyse weitgehend beendet. Die Lösung wurde eingedampft und die Substanz auf einer Kieselgelsäule (Kieselgel für die DC) mit Dichlormethan-Methanol (85:15) eluiert. Die das Strophanthidin-β-D-chinovosid enthaltenden Fraktionen wurden zusammengefaßt und aus Methanol-Äther kristallisiert. Wir erhielten Kristalle mit einem Schmelzbereich von 170 - 178°.

3.5. Vergleichende Screening-Untersuchungen von Lophopetalum toxicum, Lophopetalum wightianum und Lophopetalum arnhemicum

Die methanolischen 1:20-Kaltmazerate von Lophopetalum toxicum und L.wightianum (Stammrinden) und die äthanolischen Auszüge von L.arnhemicum (Stammrinde, Blätter) wurden nach folgender Methodik untersucht:

Herzglykoside:

Die Extrakte wurde auf Kieselgelplatten in verschiedenen Laufmitteln gegen Vergleichssubstanzen wie Digitoxin, Convallatoxin, k-Strophanthosid, g-Strophanthin, Scillaren A, Hellebrin und Helleborogenon entwickelt und als Vorproben mit KEDDE-Reagenz,

Antimon-(III)-chlorid in Chloroform und konzentrierter Schwefelsäure detektiert. Das Ansprechen auf KEDDE sowie UV-Fluoreszenz und Verfärbung am Tageslicht mit Schwefelsäure waren Indizien für γ-Lactonring, Steroidgerüst und Zucker.
Einen Hinweis auf das Vorliegen von Herzglykosiden gab der bittere Geschmack von L.toxicum-Pulver. (Bei L.wightianum dürfte der dreimal höhere Trockenextraktanteil die Geschmacksempfindung stören).

Alkaloide:
Die in den Laufmittelsystemen +) und ++) entwickelten Kieselgelplatten wurden mit dem hochempfindlichen, nach RUBIA und GOMEZ modifizierten DRAGENDORFF-Reagenz [10] detektiert. Die anfänglich unterschiedlich dunkelbraunen Flecken auf graubraunem Grund wandelten sich nach mehrtägigem Stehenlassen an der Luft in einheitlich orange auf weißem Grund um.

Zusätzlich wurden die alkaloidspezifischen Fällungsreaktionen nach VALSER [11], MAYER [12] und WAGNER [12] durchgeführt.

(VALSER'S Reagenz = Kaliumquecksilberjodidlösung:
15 g fein gepulvertes Quecksilber-(II)-jodid werden in 100 ml einer 10%igen wässrigen Kaliumjodidlösung gelöst.

MAYER'S Reagenz = Kaliumquecksilberjodidlösung:
1.36 g Quecksilber-(II)-chlorid werden in 60 ml Wasser gelöst, mit 10 ml einer 50%igen Kaliumjodidlösung verrührt und die Mischung mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

WAGNER'S Reagenz = Jod-Kaliumjodid-Lösung:
1.27 g fein gepulverte Jodkristalle werden in 5 ml einer 40%igen wässrigen Kaliumjodidlösung gelöst und die Lösung mit Wasser auf 100 ml verdünnt).

Die Extrakte enthielten keine quartären Ammoniumverbindungen (DC-Laufverhalten). Die filtrierten Chloroformlösungen wurden daher mehrmals mit 10%iger Salzsäurelösung ausgeschüttelt. Nach tropfenweisem Zusatz der Reagenzien zu den salzsauren Auszügen kommt es bei Anwesenheit von Alkaloiden zu Fällungen oder Trübungen, oft allerdings erst nach mehrstündigem Stehenlassen, je nach Konzentration. (Störung: Nicht entferntes Chloroform täuscht positives Ergebnis vor).

+) Diisopropyläther-Dichlormethan-Äthylacetat-Äthanol (50:30:15:1)
++) Toluol-Äthylacetat-Methanol (6:4:1)

Flavonoide:
Im Laufmittelsystem Äthylacetat-Ameisensäure-Essigsäure-Wasser (100:17.5:6:30) erfolgte die Detektion wie angegeben (siehe S. 124). Als Vergleichssubstanzen wurden Rutin, Chlorogensäure, Hyperosid, Quercetin und Vitexin aufgetragen.

4. Ergebnisse

4.1. Meßdaten

Glykosid D 1 = Strophanthidin-3-β-O-β-6-desoxy-D-allopyranosid

$C_{29}H_{42}O_{10}$ (550.6)

DC: $R_f = 0.54$, $\frac{R_f \text{ D 1}}{R_f \text{ Convallatoxin}} = 1.12$ (Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) (Kieselgel)

HPLC: $\frac{R \text{ D 1}}{R \text{ Convallatoxin}} = 1.5$ (20% Acetonitril/Wasser)

ZA: $\frac{t_R \text{ 6-Desoxyallose}}{t_R \text{ Rhamnose}} = 1.33$

Smp.: 170 - 174°, Lit. 163 - 165° / 183 - 186° [38]
177 - 181° [47]

UV: (Äthanol): λ max = 217 nm (log ε = 4.22)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}):
3440, 2940, 2880 (≻CH-, ≻CH_2, -CH_3), 1780, 1730 (α,β-ungesättigter γ-Lactonring mit freier α-Stellung), 1710 (-CHO), 1620 (≻C = C≺ des Butenolidrings), 1450, 1380, 1255; 1160, 1130, 1070, 1030 (C-O-Valenzschwingungen), 895, 845, 820, 735

FD-MS: m/z (rel.Int.%): 552 (19.9), 551 (45.4), 550 (22.8), 487 (17.7), 486 (28.1), 433 (33.3), 421 (17.2), 407 (11.5), 406 (31.7), 405 (100.0), 403 (13.9), 387 (31.2), 370 (14.6), 369 (23.5), 359 (46.1), 358 (95.8), 355 (24.2), 354 (79.9), 341 (58.3), 340 (69.9), 338 (20.5), 337 (25.6), 147 (93.5)

Glykosid D 2 = Strophanthidin-3-β-O-β-6-desoxy-D-glucopyranosid

$C_{29}H_{42}O_{10}$ (550.6)

DC: R_f = 0.46, $\frac{R_f \text{ D 2}}{R_f \text{ Convallatoxin}}$ = 0.96 (Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) (Kieselgel))

HPLC: $\frac{R \text{ D 2}}{R \text{ Convallatoxin}}$ = 1.4 (20% Acetonitril/Wasser)

ZA: $\frac{t_R \text{ D 2}}{t_R \text{ Rhamnose}}$ = 2.58

Smp.: 168 - 175°, D 2 synthetisch: 170 - 178°

OD: $[\alpha]_D^{26^\circ}$ = +8.7° (c = 0.43, Methanol)

UV: (Äthanol): λ max = 217 nm (log ε = 4.14)
D 2 synthet.: λ max = 217 nm (log ε = 4.15)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}):
3440, 2920, 2860, 1780, 1730, 1620, 1440, 1370, 1270, 1155, 1100, 1050, 1025, 995, 935, 910, 865, 810, 710

FD-MS: m/z (rel.Int.%): 591 (12.9), 590 (33.5), 589 (63.7), 575 (11.3), 574 (27.0), 573 (100.0), 561 (9.1), 501 (9.1), 546 (15.1), 545 (63.7), 443 (5.5), 416 (23.7), 359 (10.7), 240 (17.5), 178 (9.7)

D 2 synthet.: 591 (17.0), 590 (27.7), 589 (100.0), 575 (20.2), 574 (25.2), 573 (98.3), 562 (6.8), 561 (31.0), 551 (3.1), 546 (21.0), 545 (81.4), 443 (2.5), 405 (3.4), 360 (21.0), 359 (21.0), 358 (65.9), 341 (5.1), 340 (14.1), 147 (11.3)

^{1}H-NMR: ($DMSO_{d-6}$, 90 MHz, TMS int.)
δ = 10.059 ppm (s, 1H, C-19), 5.94 ppm (s, 1H, C-22), 4.96 ppm (s, 2H, C-21), 0.86 ppm (s, 3H (doppelt), C-18 und C-19).
Zuckerprotonen: = 3.05 - 4.1 ppm
anomeres H: = 4.35 ppm, J = 7.8 Hz

k-Strophanthidin-3-β-D-β-6-desoxy-D-glucopyranosid-triacetat

$C_{35}H_{48}O_{13}$

Smp: 266 - 267° (krist. aus Äthanol)

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$, 60 MHz, TMS int.):
δ (ppm): 0.9 (s, C-18 -CH_3, tert.); 1.25 (d, C'-6-CH_3, J = 6 Hz); 1.4 - 1.9 (m, C-3-OH; Methylengruppen); 1.8 (s, -OH); 2.0 (s, 3H, -OAc); 2.05 (s, 6H, -OAc); 2.75 (m, 1H, C-17); 3.6 (m, 1H, C'-5); 3.75 (s, -OH); 4.2 (m,C-3-CH-O-); 4.6 - 5.4 (6H, C'-1, -2, -3, -4, C-21-CH_2O); 5.9 (1H, C-22-CH=); 8.5 (1H, C-19-CHO)

Glykosid D 3 = Antiarigenin-3-β-D-β-6-desoxy-D-allopyranosid

$C_{29}H_{42}O_{11}$ (566.6)

DC: R_f = 0.42, $\frac{R_f \text{ D 3}}{R_f \text{ Convallatoxin}}$ = 0.87 (Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) (Kieselgel))

HPLC: $\frac{R \text{ D 3}}{R \text{ Convallatoxin}}$ = 0.23 (20% Acetonitril/Wasser)

ZA: $\frac{t_R \text{ 6-Desoxyallose}}{r_R \text{ Rhamnose}}$ = 1.33

Smp.: 227 - 230°, Lit.: 227 - 230° [38]

UV: (Äthanol): λmax = 217 nm (log ε = 4.14)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}):
3420, 2920, 2870, 1730, 1625, 1445, 1405, 1375, 1335, 1150, 1110, 1060, 1015, 990, 935, 890, 840, 815, 775, 700

FD-MS: m/z (rel.Int.%): 589 (9.5), 568 (12.0), 567 (49.2), 566 (100.0), 538 (4.5), 449 (7.8), 422 (19.8), 421 (34.0), 420 (34.1), 403 (27.8), 402 (37.8), 385 (9.5), 375 (18.2), 374 (70.4), 372 (39.7), 357 (20.3), 356 (53.0), 340 (4.8), 312 (3.5), 294 (3.1), 147 (53.3), 128 (24.4), 126 (13.4), 110 (11.0), 84 (3.6)

Glykosid E = Strophanthidin-3-β-O- [4-O-β-D-allopyranosyl-β-6-desoxy-D-allopyranosid]

$C_{35}H_{52}O_{15}$ (712.8)

DC: R_f = 0.22, $\frac{R_f\ E}{R_f\ \text{Convallatoxin}}$ = 0.46 (Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) (Kieselgel))

HPLC: $\frac{R\ E}{R\ \text{Convallatoxin}}$ = 0.71 (20% Acetonitril/Wasser)

ZA: $\frac{t_R\ \text{6-Desoxyallose}}{t_R\ \text{Rhamnose}}$ = 1.33 $\frac{t_R\ \text{Allose}}{t_R\ \text{Rhamnose}}$ = 3.05

Smp.: 187 - 192°

OD: $[\alpha]_D^{21°}$ = +7.63° (c = 0.488, Methanol)

UV: (Äthanol): λ max = 217 nm (log ε = 4.21)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}):
3440, 2935, 2880, 1780, 1735, 1715, 1620, 1440, 1370, 1335, 1295, 1250, 1150, 1120, 1100, 1060, 1020, 880, 835, 815, 700

FD-MS: m/z (rel.Int.%): 753 (15.1), 751 (50.8), 737 (23.2), 736 (12.9), 735 (100.0), 725 (6.7), 723 (17.8), 708 (8.1), 707 (63.7), 689 (7.0), 589 (10.2), 574 (7.2), 573 (17.3), 545 (6.7), 527 (3.8), 443 (8.3), 427 (11.9), 399 (5.4), 379 (8.6), 365 (4.8), 349 (4.8), 340 (3.7), 322 (4.3), 128 (8.6), 126 (3.2), 110 (2.7)

D/IC: m/z (rel.Int.%): 733 (6.6), 732 (22.2), 731 (67.7), 730 (100.0), 714 (10.2), 713 (20.0), 712 (4.5), 702 (4.4), 686 (4.4), 570 (4.4), 569 (11.5), 568 (30.2), 552 (4.0), 551 (11.1), 550 (2.0), 423 (7.5), 422 (26.6), 406 (2.6), 405 (8.0), 404 (5.5)

^{13}C-NMR: (10 mg, $DMSO_{d-6}$, 20.15 MHz, ppm)
Werte siehe Allgem.Teil S. 58 ff.

Glykosid F = Strophanthidin-3-β-O-[3-O-β-D-glucopyranosyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid]

$C_{35}H_{52}O_{15}$ (712.8)

DC: $R_f = 0.2$, $\frac{R_f\ F}{R_f\ \text{Convallatoxin}} = 0.41$ (Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) (Kieselgel))

HPLC: $\frac{R\ F}{R\ \text{Convallatoxin}} = 0.71$ (20% Acetonitril/Wasser)

ZA: $\frac{t_R\ \text{6-Desoxytalose}}{t_R\ \text{Rhamnose}} = 0.88$, $\frac{t_R\ \text{Glucose}}{t_R\ \text{Rhamnose}} = 4.92$

Smp.: 201 - 205°

OD: $[\alpha]_D^{25°} = +9.35°$ (c = 0.8705, Methanol)

UV: (Äthanol): λ max = 217 nm (log ε = 4.19)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}):
3420, 2905, 2860, 1775, 1735, 1710, 1620, 1435, 1370, 1335, 1320, 1295, 1245, 1170, 1150, 1110, 1055, 1020, 905, 885, 865, 830, 810, 750, 715

FD-MS: m/z (rel.Int.%): 753 (11.6), 752 (13.7),751 (37.5),737 (4.7), 736 (28.8), 735 (100.0), 713 (9.4), 707 (12.4), 700 (7.1), 573 (8.2), 427 (4.3), 368 (21.4), 359 (12.4), 358 (38.0), 350 (28.2), 341 (14.2), 340 (55.1), 323 (12.2), 322 (32.0), 128 (6.2)

^{13}C-NMR: (10 mg, $DMSO_{d-6}$, 20.15 MHz, ppm)
Werte siehe Allgem.Teil S. 70 ff.

Glykosid G 1 = Antiarigenin-3-β-O-[3-O-β-D-gulopyranosyl-β-6-desoxy-D-talopyranosid]

$C_{35}H_{52}O_{16}$ (728.8)

DC: $R_f = 0.17$, $\frac{R_f\ G\ 1}{R_f\ \text{Convallatoxin}} = 0.35$ (Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) (Kieselgel))

HPLC: $\frac{R \text{ G 1}}{R \text{ Convallatoxin}}$ = 0.17 (20% Acetonitril/Wasser)
= 1.17 (10% Acetonitril/Wasser)

ZA: $\frac{t_R \text{ 6-Desoxytalose}}{t_R \text{ Rhamnose}}$ = 0.88

$\frac{t_R \text{ Gulose}}{t_R \text{ Rhamnose}}$ = 2.5

Smp.: 231 - 235°

OD: $[\alpha]_D^{25°}$ = +8.69° (c = 0.6207, Methanol)

UV: (Äthanol): λ max = 217 nm (log ε = 4.17)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}):
3440, 2940, 2885, 1735, 1720, 1630, 1450, 1410, 1380, 1345, 1305, 1255, 1155, 1090, 1070, 1030, 945, 895, 845, 820, 730

FD-MS: m/z (rel.Int.%): 753 (17.5), 752 (50.5), 751 (100.0), 737 (12.3), 724 (8.3), 723 (31.5), 589 (9.6), 443 (6.9), 387 (12.9)

D/IC: m/z (rel.Int.%): 748 (9.3), 747 (22.2), 746 (44.4), 729 (12.8), 718 (6.6), 585 (16.6), 584 (57.7), 567 (16.6), 566 (11.1), 489 (31.1), 488 (100.0), 472 (15.5), 471 (57.7), 470 (11.1), 438 (37.7), 421 (26.6), 420 (24.4), 410 (10.0), 403 (13.3), 402 (15.5)

^{13}C-NMR: (10 mg, $DMSO_{d-6}$, 20.15 MHz, ppm)
Werte siehe Allgem.Teil S. 79 ff.

Glykosid G 2 = Antiarigenin-3-β-O-[4-O-β-D-allopyranosyl-β-D-allopyranosid]

$C_{35}H_{52}O_{16}$ (728.8)

DC: R_f = 0.15, $\frac{R_f \text{ G 2}}{R_f \text{ Convallatoxin}}$ = 0.31 (Äthylacetat-Äthanol-Methanol-Wasser (100:5:13.4:10) (Kieselgel))

HPLC: $\frac{R \text{ G 2}}{R \text{ Convallatoxin}}$ = 0.17 (20% Acetonitril/Wasser)
= 1.33 (10% Acetonitril/Wasser)

ZA: $\frac{t_R \text{ 6-Desoxyallose}}{t_R \text{ Rhamnose}}$ = 1.33 $\frac{t_R \text{ Allose}}{t_R \text{ Rhamnose}}$ = 3.05

Smp.: 215 - 218°

OD: $[\alpha]_D^{25°}$ = +5.62 (c = 0.55, Methanol)

UV: (Äthanol) λ max = 217 nm (log ε = 4.14)

IR: (KBr) ν (cm^{-1}):
3430, 2920, 2880, 1785, 1735, 1720, 1630, 1450, 1410, 1380, 1340, 1305, 1250, 1195, 1155, 1105, 1070, 1030, 945, 895, 845, 825

FD-MS: m/z (rel.Int.%): 753 (15.7), 752 (34.4), 751 (100.0), 724 (8.7), 723 (19.7), 707 (2.9), 589 (6.4), 562 (3.0), 443 (1.6), 387 (10.1), 317 (31.1)

D/IC: m/z (rel.Int.%): 748 (12.2), 747 (34.4), 746 (66.6), 730 (12.2), 729 (20.0), 728 (15.5), 718 (22.2), 700 (21.1), 585 (34.4), 584 (100.0), 568 (16.6), 567 (25.5), 566 (11.1), 556 (23.3), 538 (13.3), 438 (55.5), 421 (28.8), 420 (15.5), 410 (20.0)

^{13}C-NMR: (10 mg, $DMSO_{d-6}$, 20.15 MHz, ppm)
Werte siehe Allgem.Teil S. 86 ff.

Hellebrin = Hellebrigenin-3-β-O-[4-O-β-D-glucopyranosyl-α-L-rhamnopyranosid]

Smp.: 283°

D/IC: m/z (rel.Int.%):
743 (12.2), 742 (27.7), 725 (5.3), 724 (12.2), 699 (19.5), 698 (3.3), 681 (4.4), 664 (4.3), 563 (4.4), 519 (4.4), 434 (4.4), 417 (6.6), 398 (4.4), 370 (4.6), 334 (7.3), 326 (16.6), 309 (5.5), 275 (4.4), 271 (4.4), 240 (4.8), 198 (30.0), 196 (22.2), 180 (100.0), 164 (37.7), 162 (32.2), 146 (82.2), 144 (21.5), 129 (24.4), 128 (28.4), 111 (21.1), 110 (71.1)

^{13}C-NMR: (60 mg/$DMSO_{d-6}$, 20.15 MHz, ppm)
δ = 208.166 (C-19), 161.385 (C-24), 149.47 (C-21), 147.451 (C-22), 122.714 (C-20), 114.232 (C-23), 104.64 (C"-1), 99.424 (C'-1), 83.605 (C-14), 82.125 (C'-4), 77.043 (C"-5), 77.043 (C"-3), 74.754 (C"-2), 73.34 (C-3), 73.138 (C-5), 70.917 (C'-2), 70.682 (C'-3), 70.682 (C"-4), 67.854 (C'-5), 61.662 (C"-6), 54.661 (C-10), 50.387 (C-17), 48.031 (C-13), 41.603 (C-8), 41.031 (C-12), 39.92 (C-9), 38.843 (C-4), 36.453 (C-6), 35.477 (C-15), 31.439 (C-16), 28.342 (C-2), 24.808 (C-1), 24.034 (C-7), 22.284 (C-11), 17.774 (C'-6), 16.495 (C-18)

Scillaren A = Scillarenin-3-β-O-[4-O-β-D-glucopyranosyl-α-L-rhamnopyranosid]

Smp. 270°

^{13}C-NMR: (10 mg, $DMSO_{d-6}$, 20.15 MHz, ppm)
δ = 161.003, 149.129, 147.13, 146.52, 122.41, 120.35, 113.87, 104.239, 98.847, 83.157, 82.127, 76.614, 76.614, 74.433, 72.494, 70.556, 70.253, 66.86, 61.287, 50.14, 49.413, 47.838, 41.538, 40.75, 39.66, 38.569, 37.539, 36.873, 34.692, 31.845, 28.331, 28.089, 26.514, 20.758, 18.578, 17.427, 16.336

Sarmentosid A = Sarmentosigenin-3-β-O-α-6-desoxy-L-talopyranosid

Smp.: 241 - 245°

^{13}C-NMR: (10 mg, $DMSO_{d-6}$, 20.15 MHz, ppm)
δ =208.469, 174.665, 173.241, 115.962, 99.605, 82.734, 73.404, 72.859, 72.859, 71.98, 70.526, 67.013, 66.134, 65.529, 54.563, 53.988, 49.293, 48.808, 48.112, 47.839, 47.597, 45.991, 44.144, 42.75, 41.69, 40.206, 36.42, 35.082, 31.482, 26.272, 26.0, 25.242, 23.486, 22.577, 19.517, 19.063, 16.579, 16.186, 16.156

Convallatoxin = k-Strophanthidin-3-β-O-α-L-rhamnopyranosid

Smp.: 236 - 242°

FD-MS: m/z (rel.Int.%)
a) ohne Salzzugabe:
551 (5.6), 405 (7.0), 403 (2.9), 385 (9.1), 384 (2.9), 359 (3.5), 358 (14.5), 357 (4.2), 341 (9.8), 340 (14.0), 148 (14.0), 147 (100.0)

b) mit Salzzugabe (NaCl) (ca. 0.5%):
591 (18.5), 590 (27.8), 589 (78.5), 575 (9.5),574(37.1) 573 (100.0), 562 (3.1), 561 (13.5), 546 (14.3), 545 (38.5), 385 (5.7), 147 (38.5)

k-Strophanthosid = k-Strophanthidin-3-β-O-[6-O-β-D-glucopyranosyl-4-β-D-glucopyranosyl-β-D-cymarosid]

Smp.: 199 - 200°

FD-MS: m/z (rel.Int.%)
a) ohne Salzzugabe:
428 (5.3), 427 (16.9), 405 (14.0), 404 (4.2), 387 (3.8), 359 (19.0), 358 (100.0), 357 (3.5), 356 (12.8), 341 (7.3), 340 (25.3)

b) mit Salzzugabe (NaCl) (ca. 0.5%):
912 (5.6), 911 (8.4), 910 (3.5), 898 (12.6), 897 (15.5), 896 (10.2), 895 (100.0), 880 (7.0), 867 (8.4), 733 (1.5), 460 (1.4), 358 (1.6), 340 (1.4)

4.2. Identifizierung von weiteren Cardenoliden aus Lophopetalum toxicum

Nicht isoliert, jedoch stark angereichert wurden folgende KEDDE-positiven Substanzen: A, C, D 4

Durch DC-Vergleich in verschiedenen Laufmitteln (siehe Exp.Teil S. 123), Farb- und Fluoreszenzreaktionen (siehe Exp.Teil S. 123) sowie HPLC-Vergleich (siehe Allg.Teil 4.3., S.101) konnten folgende Zuordnungen getroffen werden.

A = k-Strophanthidin
C = Antiarigenin
D 4 = β-Antiarin (Antiarigeninrhamnosid)

5. Herkunft der Vergleichssubstanzen

Die folgenden Vergleichssubstanzen wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

Antiallosid, β-Antiarin, Bipindosid — von Prof.Dr.T.Reichstein, Basel

Helleborogenon, Hellebrin — von Prof.Dr.J.Petricic, Zagreb

Strophallosid, Strophanollosid — von Prof.Dr.T.Reichstein, Basel
Strophanollosid — von Prof.Dr.W.Kubelka, Wien

Thollosid — von Prof.Dr.T.Reichstein, Basel

Aus unserem Institutsbestand stammten:

Adonitoxin	Descheirotoxin	Evonosid
Convallatoxol	Evomonosid	Scillaren A

Die FD-MS-Untersuchungen wurden vorgenommen mit:

Convallatoxin Fa.Merck,Darmstadt, Art.Nr. 24535
k-Strophanthosid Fa.Roth,Karlsruhe, Art.Nr. 1 - 8340

Alle anderen Herzglykoside sind im Handel erhältlich.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) DING HOU: Flora Malesiana I, 6^2, 269 (1962)
2) QUISUMBING, L.R.: "Medicinal Plants of the Philippines", S. 545, (1951)
3) LOHER, A.: Icones Boger 1, 55 (1897)
4) BRILL, H.C. und A.H.WELLS: Philippine J.Sci. 12, 169 (1917)
5) GALVIALO: Pharm.J. and Pharmacist 27, 281 (1915)
6) DIETERLE, H., H.LEONHARDT und K.DORNER: Arch.Pharmaz. 271, 264 (1933)
7) DIETERLE, H., H.LEONHARDT und K.DORNER: Arch.Pharmaz. 272, 172 (1934)
8) KEDDE, D.L.: Pharm.Weekbl. 82, 741 (1947)
9) LEWBART, M.L., W.WEHRLI und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 46, 505 (1963)
10) RUBIA, L.B. und R.GOMEZ: J.Pharm.Sci. 66, 1656 (1977)
11) TRAVELL, J.: J.Pharm.Sci. 33, 684 (1934)
12) CROMWELL, B.T.: "Modern Methods in Plant Analysis", S. 373 (1955)
13) FARNSWORTH, N.R., N.A.PILEWSKI und F.J.DRAUS: Lloydia 25, 312 (1962)
14) REITER, M.: Arzneimittelforschung 17, 1249 (1967)
15) STOLL, A. und W.KREIS: Helv.Chim.Acta 16, 1049 (1933)
16) MANNICH, C., P.MOHS und W.MAUSS: Arch.Pharmaz. 268, 453 (1930)
17) STOLL, A. und W.KREIS: Helv.Chim.Acta 16, 1049 (1933)
18) TAMM, C. und R.REPIC: Helv.Chim.Acta 40, 639 (1957)
19) KOVAR, K.-A., G.FRANCAS und R.SEIDEL: Arch.Pharmaz. 310, 40 (1977)
20) KOVAR, K.-A.: Pharm.Unserer Zeit 1, 17 (1972)
21) STRAUB, W.: DRP 575 496
22) FLITSCH, K.: Dissertation Universität München in Vorbereitung
23) BAUMGARTEN, G.: "Die herzwirksamen Glykoside", Edition Leipzig (1963), S. 171
24) RAYMOND, W.D.: Analyst (London) 63, 478 (1938)
25) RAYMOND, W.D.: Analyst (London) 64, 113 (1939)
26) BALJET, H.: Schweiz.Apoth.-Ztg. 56, S. 71 und 84 (1918)
27) BECKER, H. und S.RICHTER: Pharm.Ztg. 120, 441 (1975)
28) JENSEN, K.B.: Acta pharmacol. toxicol. 9, 99 (1953)
29) TAKEDA, K., S.HARA, A.WADA und N.Matsumoto: J.Chromatog.5,217 (1963)
30) ARREGUINE, V. und P.E.PASQUALIS; Rev.Univ.nac.Córdoba (Argentinien) 32, 439 (1945)
31) PESEZ, M.: Ann.pharm.franc. 10, 104 (1952)
32) HOSTETTMANN, K.: Planta medica 39, 1 (1980)
33) COOMBE, R.G. und T.R.WATSON: Austr.J.Chem. 17, 92 (1964)
34) KILIANI, H.: Ber.dtsch.chem.Ges. 63, 2866 (1936)
35) MANNICH, C. und G.SIEWERT: Ber.dtsch.chem.Ges. 75, 737 (1942)
36) WEISS, E., O.SCHINDLER und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 41, 736 (1958)
37) KARTNIG, T. und O.WEGSCHAIDER: J.Chromatog. 61, 375 (1971)
38) KHAVE, M.P., O.SCHINDLER und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 45, 1534 (1962)
39) MÜHLRADT, P., E.WEISS und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 47, 2164 (1964)

40) ALLGEIER, H., E.WEISS und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 50, 431 (1967)
41) KUBELKA, W., B.KOPP und K.JENTZSCH: Pharm.Acta Helv. 50, 353 (1975)
42) BILIK, V., W.VOELTER und E.BAYER: Angew.Chem. 23, 967 (1971)
43) KAWASAKI, T. (Fukuoka, Japan): Testsubstanz aus Ipomoea orizabensis (unveröffentlicht)
44) SCHWARTING, G.: Dissertation Universität München, 1974
45) KAISER, F., E.HAACK und H.SPINDLER: Liebigs Ann.Chem. 688, 216 (1965)
46) HARTENSTEIN, J. und G.SATZINGER: Liebigs Ann.Chem. (11), 1763 (1974)
47) FETIZON, M. und M.GOLFIER: C.R.Acad.Sc.Paris ser. C 267, 900 (1968)
48) KAISER, F.: Chem.Ber. 88, 556 (1955)
49) HUDSON, C.S.: Ref. in "The Monosaccharides", J.Staněk, Academic Press New York und London (1963) S. 50 ff.
50) KLYNE, W.: Biochem.J. 47, xli (1950)
51) BRIMACOMBE, J.S. und A.HUSAIN: Carbohydr.Res. 6, 491 (1968)
52) LEVENE, P.A. und J.COMPTON: J.biol.Chem. 116, 169 (1936)
53) BOCK, K. und C.PEDERSEN: Acta Chem.Scand. B 29, 258 (1975)
54) DORMAN, D.E. und J.D.ROBERTS: J.Amer.Chem.Soc. 92, 1355 (1970)
55) GORIN, P.A.J.: Can.J.Chem. 52, 458 (1974)
56) GORIN, P.A.J. und M.MAZUREK: Can.J.Chem. 53, 1212 (1975)
57) COLSON, P. und R.R.KING: Carbohydr.Res. 47, 1 (1976)
58) NOVER, L., G.BAUMGARTEN und M.LUCKNER: J.Chromatog. 32, 93 (1968)
59) NOVER, L., G.JÜTTNER, S.Noack, G.BAUMGARTEN und M.LUCKNER: J.Chromatog. 39, 419 (1969)
60) ANGYAL, S.J., C.L.BODKIN und F.W.PARRISH: Austr.J.Chem. 28, 1541 (1975)
61) STANĚK, J.: "The Monosaccharides" Academic Press New York und London (1963), S. 53
62) PFEFFER, P.E., K.M.VALENTINE und F.W.PARRISH: J.Americ.Chem.Soc. 101, 1265 (1978)
63) JUSLÉN, C., W.WEHRLI und T.REICHSTEIN: Helv. 45, 2285 (1962)
64) SCHULTEN, H.-R. und D.E.GAMES: Biomed.Mass Spectromet. 1, 120 (1974)
65) WAGNER, H., H.HABERMEIER, A.LIPTAK und H.-R.SCHULTEN: Planta medica 37, 381 (1979)
66) RÖLLGEN, F.W. und H.-R.SCHULTEN: Org.Mass Spectromet. 10, 660 (1975)
67) PROME, J.-C. und G.PUZO: Org.Mass.Spectromet. 12, 28 (1977)
68) VEITH, H.J.: Tetrahedron 33, 2825 (1977)
69) KOMORI, T., M.KAWAMURA, K.NIYAHARA, T.KAWASAKI, O.TANAKA, S.YAHARA und H.-R.SCHULTEN: Z.Naturforsch. (received 20.7.79)
70) Bulletin d'application No. 25, NERMAG S.A., Paris
71) BERTRAM, J.: Pharm.Unserer Zeit 9, 81 (1980)
72) VOELTER, W., H.BAUER und W.U.HOFMANN: G-I-T Fachz.Lab. 18, 331 (1974)
73) MOPPER, K. und E.T.DEGENS: Anal.Biochem. 45, 147 (1972)
74) SIMATUPANG, M.H.: Mitt.Bundesforschungsanst.Forst-Holzwirtsch. Reinbeck 93, 251 (1972)

75) BAUER, H.: Dissertation Universität Tübingen, 1975
76) SINNER, M., M.H.SIMATUPANG und H.H.DIETRICHS: Wood Sci.Technol. 9, 307 (1975)
77) SIMATUPANG, M.H.: J.Chromatog. 180, 177 (1979)
78) WAGNER, H., H.HABERMEIER und G.WEGENER: Planta medica 39, 135 (1980)
79) WEITZEL, G., F.SCHNEIDER, A.-M.FRETZDORFF, J.DURST und W.-D. HIRSCHMANN: Hoppe-Seylers Z.Physiolog.Chem. 348, 433 (1967)
80) HARTWELL, J.L.: Lloydia 30 (1967), 31 (1968), 32 (1969), 33 (1970), 34 (1971):"Plants used against Cancer"
81) KUPCHAN, S.M., M.A.EAKIN und A.M.THOMAS: J.Med.Chem. 14, 1147 (1971)
82) CORDELL, G.A. und N.R.FARNSWORTH: Proceedings of the Round-Table held by SIMES S.p.A. la Cardioterapica at" Villa Simes" July 5, 1974: "Structure - activity relationships of Plant Antitumor Agents"
83) PORTIUS, H.J. und K.REPKE: Arzneimittelforschung 14, 1073 (1964)
84) DING HOU: Flora Malesiana I, 6^2, 267 (1962)
85) BYRNES, N.: Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, Vol 96, Part 2, S. 67 (1971)
86) HÖRHAMMER, L., H.WAGNER und G.BITTNER: Arzneimittelforschung 13, 537 (1963)
87) HÖRHAMMER, H.P.: Dissertation Universität München, 1966
88) BRÜNING, R. und H.WAGNER: Phytochemistry 17, 1821 (1978)
89) OLIVEROS-BELARDO, L.: P PhA and Souvenir Program, Jan.-April 1975, 61, (1-4), S. 35
90) PETIT, A., M.PESEZ, P.BELLET und G.AMIARD: Bull.Soc.chim.France, Mém. [5] , 17, 288 (1950)
91) TSCHESCHE, R. in: Lettré - Inhoffen- Tschesche: "Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Nautrstoffe", F.Enke-Verlag (1954), Band 1, S. 301
92) SCOTT, A.I.: "Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products", Vol. 7 (1964), S. 235
93) TSCHESCHE, R. in: Lettré - Inhoffen - Tschesche: "Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe" F.Enke-Verlag (1954), Band 1, S. 296
94) FENGEL, D., M.PRZYKLENK und G.WEGENER: Holzforschung 31, 65 (1977)
95) WICHTL, M., K.JENTZSCH und E.TÜRK: Monatsh.Chem. 103, 889 (1972)
96) MOORE, J.A., C.TAMM und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 37, 755 (1954)
97) KRAUSS, M.T., H.JÄGER, O.SCHINDLER und T.REICHSTEIN: J.Chromatog. 3, 63 (1960)
98) KAUFMANN, H., P.MÜHLRADT und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 50, 2287 (1967)
99) HUBER, H., F.BLINDENBACHER, K.MOHR, P.SPEISER und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 34, 46 (1951)
100) MAKAREVICH, I.F., O.I.KLIMENKO und D.G.KOLESNIKOV: Khim.Prir. Soedin 5, 611 (1974)
101) TORI, K., H.ISHII, Z.W.WOLKOWSKI, C.CHACHATY, M.SANGARÉ, F.PIRIOU und G.LUKACS: Tetrahedron Letters 1077 (1973)
102) HEMBREE, J.A., C.-J.CHANG, J.L.McLAUGHLIN, G.PECK und J.M. CASSADY: Lloydia 42, 293 (1979)

103) VERPOORTE, R., PHAN-QUÔC-KINH und A.B.SVENDSEN: Lloydia 43, 347 (1980)
104) SCHENK, B., P.JUNIOR und M.WICHTL: Planta medica 40, 1 (1980)
105) JACOBS, W.A. und M.HEIDELBERGER: J.biol.Chem. 54, 253 (1922)
106) BROWN, P., F.BRÜSCHWEILER, G.R.PETIT und T.REICHSTEIN: Org. Mass Spectrom. 5, 573 (1971)
107) BOCK, K., I.LUNDT und C.PEDERSEN: Tetrahedron Letters 1037 (1973)
108) GUT, M. und D.A.PRINS: Helv.Chim.Acta 29, 1555 (1946)
109) KARRER, W.: "Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe", Birkhäuser-Verlag (1958)
110) WAGNER, H. und K.JURCIC: Veröffentlichung Universität München, in Vorbereitung
111) STIEHLE, H.R.: Dissertation Universität München, in Vorbereitung
112) TAMM, C. und J.P.ROSSELET: Helv.Chim.Acta 36, 1309 (1953)(Struktur)
113) KISLICHENKO, S.G., I.F.MAKAREVICH und D.G.KOLESNIKOV: Khim.Prir. Soedin 3, 241 (1967), ref.C.A. 67, 105338 c (1967)
114) KISLICHENKO, S.G., I.F.MAKAREVICH und D.G.KOLESNIKOV: Khim. Prir.Soedin 5, 193 (1969), ref.C.A. 71, 105160 w (1969)
115) KISLICHENKO, S.G., I.F.MAKAREVICH, I.P.KOVALEV und D.G. KOLESNIKOV: Khim.Prir.Soedin 5, 386 (1969), ref.C.A. 72, 79305 w (1970)
116) SANTAVÝ, F. und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 31, 1655 (1948)
117) HAUENSTEIN, H., A.HUNGER und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 36, 87 (1953)
118) TSCHESCHE, R., S.WIRTZ und G.SNATZKE: Chem.Ber. 88, 1619 (1955)
119) BLISS, C.A. und E.RAMSTAD: J.Amer.Pharm.Ass. 46, 423 (1957)
120) KISLICHENKO, S.G. und I.F.MAKAREVICH: Khim.Prir.Soedin (6), 804 (1973), ref.C.A. 82, 28562 b (1975)
121) SHIMADA, K. und T.NAMBARA: Heterocycles 12, 1445 (1979)
122) KUPCHAN, S.M., I.UCHIDA, K.SHIMADA, B.Y.FEI, D.M.STEVENS, A.T.SNEDEN, R.W.MILLER und R.F.BRYAN: J.C.S.Chem.Comm. 255 (1977)
123) SINGH, B. und R.P.RASTOGI: Phytochemistry 11, 757 (1972)
124) CARMAN, R.M,, R.G.COOMBE und T.R.WATSON: Aust.J.Chem. 17, 573 (1964)
125) YAMAUCHI, T., K.MIYAHARA, F.ABE und T.KAWASAKI: Chem.Pharm. Bull. 27, 2463 (1979)
126) LICHTI, H., J.v.EUW, K.STÖCKEL, J.POLONIA und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 55, 1695 (1972)
127) STEVENS, P.J.: J.Chromatog. 14, 269 (1964)
128) BRÜSCHWEILER, F., K.STÖCKEL und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 52, 2276 (1969)
129) NEU, R.: Naturwissenschaften 44, 181 (1957)
130) TSCHESCHE, R. und H.J.WULFF: Chem.Ber. 106, 3010 (1973)
131) MARTIN, R.P. und C.TAMM: Helv.Chim.Acta 42, 696 (1959)
132) TITTEL, G. und H.WAGNER: Planta medica 39, 125 (1980)
133) TITTEL, G., J.GREVEL und H.WAGNER: Vortrag: Königsteiner Chromatographie-Tage 29.-30.9.1980, Salzburg/Österreich
134) NOVER, L., G.JÜTTNER, S.NOACK, G.BAUMGARTEN, M.LUCKNER: J.Chromatog. 39, 419 (1969)
135) KUPCHAN, S.M., J.R.KNOX und J.E.KELSEY: Science 146, 1685 (1964)
136) SINGH, B. und RASTOGI, R.P.: Ind.J.Chem. 7, 1105 (1969)

137) BROWN, P., J.v.EUW, T.REICHSTEIN, K.STÖCKEL und T.R.WATSON: Helv.Chim.Acta 62, 412 (1979)
138) SEIBER, J.N., C.N.ROESKE und J.M.BENSON: Phytochemistry 17, 967 (1978)
139) MITTAL, O.P., C.TAMM und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 45, 907 (1962)
140) LARDON, A., K.STÖCKEL und T.REICHSTEIN: Helv.Chim.Acta 52, 1940 (1969)
141) LICHTI, H. und A.v.WARTBURG: Helv.Chim.Acta 43, 1666 (1960)
142) REICHSTEIN, T. und E.WEISS: Advances in Carbohydrate Chem. 17, 65 (1962)
143) VOELTER, W. und E.BREITMAIER: Org.Magn.Resonance 5, 311 (1973)

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders danken:

Herrn Professor Dr. H. Wagner für die Anregung zu dieser Arbeit und deren großzügige Förderung.

Herrn Professor Dr. H.-R. Schulten, Institut für Physikalische Chemie der Universität Bonn, für die Aufnahme der FD-massenspektroskopischen Aufnahmen.

Herrn Dr. V.M. Chari, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. G. Wegener, Institut für Holzforschung der Universität München, für die freundliche Zusammenarbeit bei den vielen von ihm vorgenommenen Zuckeranalysen.

Herrn Dr. A. Liptak, Institute of Biochemistry, L.Kossuth University, Debrecen/Ungarn, für die Hilfe bei der durchgeführten Synthese.

Herrn Dr. G. Tittel, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, für die Zusammenarbeit bei der HPLC-Analytik an unserem Institut.

Herrn Professor Dr. M. Reiter, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München, und Frau Dr. K. Jurcic an unserem Institut für die Durchführung der pharmakologischen Tests.

Herrn Professor Dr. T. Reichstein, Institut für Organische Chemie der Universität Basel/Schweiz, für die freundliche und schnelle Überlassung von Testsubstanzen.

Danken möchte ich darüberhinaus allen nicht genannten Institutsangehörigen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

L E B E N S L A U F

Helmut Georg Leonhard	H a b e r m e i e r geboren am 8. Juli 1952 in Mühldorf/Inn	
Eltern:	Leonhard Habermeier, Kaufmann und Paula Habermeier, geb. Hermann	
Wohnort:	Mühldorf/Inn	
Schulbildung:	1958 - 1962 1962 - 1971	Volksschule Mühldorf Ruperti-Gymnasium Mühldorf/Inn
Berufsausbildung:	1971 - 1973	Praktikant in der Engel-Apotheke Mühldorf
Pharm.Vorprüfung:	2. Juli 1973	München
Studium der Pharmazie:	WS 1973/74 bis WS 1976/77	Ludwig-Maximilians- Universität München
Pharm.Staatsprüfung:	26. April 1977	
Approbation:	18. Mai 1977	
Wissenschaftliche Tätigkeit:	1. Juli 1977 bis 28. Febr.1981	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München Promotionsarbeit unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner